

Aus der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

Charakterisierung einer Nestin-positiven Stammzellpopulation aus humanen Schweißdrüsen

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck
Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorlegt von Sabine Nagel
aus Neuruppin

Lübeck 2013

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Charli Kruse
2. Berichtstatter: Prof. Dr. Jens Habermann

Mündlicher Prüfungstermin: 12.06.2013

Zum Druck genehmigt: 14.06.2013

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Stammzellen.....	1
1.1.1 Embryonale Stammzellen	1
1.1.2 Adulte Stammzellen.....	3
1.2 Haut und ihre Anhangsgebilde	4
1.2.1 Aufbau der Haut	5
1.2.1.1 Epidermis.....	5
1.2.1.2 Dermis	6
1.2.1.3 Subkutis.....	7
1.2.2 Drüsen der Haut	7
1.2.2.1 Evolutionäre und embryonale Entwicklung der Schweißdrüsen	8
1.2.2.2 Ekkrine Schweißdrüsen.....	9
1.2.2.3 Apokrine Schweißdrüsen.....	11
1.2.3 Haare.....	12
1.2.4 Stammzellquellen der Haut	14
1.3 Regeneration der Haut.....	16
1.3.1 Phasen der Hautwundheilung	17
1.3.2 Regenerative Therapien in der Wundheilung.....	18
1.4 Ziel dieser Arbeit	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Kits.....	25
2.1.4 Geräte.....	25
2.1.5 Software	26
2.1.6 Lösungen.....	26
2.1.7 Zelllinien und Langzeit-Zellkulturen.....	28
2.1.8 Zellkulturmedien	28

2.1.9 Antikörper	30
2.1.10 Primer	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Schweißdrüsenisolation aus der humanen Haut.....	33
2.2.1.1 Schweißdrüsenisolation nach dem bisherigen Verfahren	33
2.2.1.2 Verfahrensoptimierung der Schweißdrüsenisolation.....	34
2.2.2 Zellkultur	38
2.2.2.1 Subkultivierung der Zellen	38
2.2.2.2 Kryokonservierung.....	39
2.2.2.3 Auftauen kryokonservierter Zellen.....	39
2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl	39
2.2.2.5 MTT-Test	39
2.2.2.6 Wachstumskurven	40
2.2.3 Molekularbiologische Expressionsanalyse.....	41
2.2.3.1 RNA-Isolation	41
2.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	41
2.2.3.3 cDNA-Synthese	41
2.2.3.4 Quantitative PCR.....	42
2.2.3.5 Kapillargelelektrophorese	43
2.2.4 Proteinbiochemische Analysen	43
2.2.4.1 Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung.....	43
2.2.4.2 Transkriptionsfaktor- Stammzellchip	45
2.2.4.3 Durchflusszytometrie	47
2.2.4.4 Zytokinsekretionsprofil.....	50
2.2.5 Induzierte Differenzierung	52
2.2.5.1 Organotypische 3D Zellkultivierung.....	52
2.2.5.2 Mesodermale Differenzierung	53
2.2.5.2.1 Adipogene Differenzierung.....	53
2.2.5.2.2 Chondrogene Differenzierung	53
2.2.5.2.3 Osteogene Differenzierung	54
2.2.6 Statistische Auswertung	54
3. ERGEBNISSE	55
3.1 Lokalisation Nestin-positiver Stammzellen im Mesenchym humaner Schweißdrüsen	55
3.2 Isolation der Schweißdrüsen und Gewinnung einer Nestin-positiven Stammzellpopulation.....	57
3.3 <i>In vitro</i> Charakterisierung der SGSCs.....	60
3.3.1 Wachstumseigenschaften	61
3.3.2 Spontanes Differenzierungspotential	63

3.3.2.1 Genexpressionsanalysen	63
3.3.2.2 Proteinexpressionsanalysen	66
3.3.2.2.1 Immunzytochemischer Nachweis des spontanen Differenzierungspotentials	66
3.3.2.2.2 Expression aktivierter Transkriptionsfaktoren	67
3.3.3 Generierung von Stammzellklonen	68
3.4 Vergleich der SGSCs mit Haut-abgeleiteten Zellpopulationen und bereits etablierten Stammzelllinien	70
3.4.1 Vergleich der spontanen Proteinexpression	70
3.4.1.1 Vergleich der Nestin Expression	70
3.4.1.2 Vergleich der <i>in vitro</i> und <i>in situ</i> Proteinexpression	71
3.4.1.3 Vergleich der Oberflächenproteinexpression	73
3.4.2 Induzierbarkeit der SGSCs	75
3.4.2.1 Ektodermale Differenzierung mittels organotypischer 3D Zellkultivierung	75
3.4.2.2 Induzierte Mesodermdifferenzierung der SGSCs im Vergleich zu den BMSCs	77
3.5 SGSCs in der Hautwundheilung	80
3.5.1 Zytokinsekretionsprofil	80
3.5.2 Schweißdrüsenkultivierung in 3D Kollagenmatrix	81
4 DISKUSSION	84
4.1 Lokalisation Nestin-positiver Stammzellen im Mesenchym humaner Schweißdrüsen	84
4.2 Etablierung des Isolationsverfahrens humaner Schweißdrüsen und <i>in vitro</i> Expansion der SGSCs	86
4.3 Spontanes, multipotentes Differenzierungspotential der SGSCs <i>in vitro</i>	89
4.4 Abgrenzung der SGSCs zu Haut-abgeleiteten Zellpopulationen und bereits etablierten Stammzelllinien	91
4.4.1 Verstärkte ektodermale Differenzierung der SGSCs	93
4.4.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen SGSCs und BMSCs	99
4.4.3 Mögliche Identität der SGSCs	101
4.5 Verbesserte Hautwundheilung durch SGSCs	103
5 FAZIT	111
6 AUSBLICK	111
7 LITERATURVERZEICHNIS	IX

8. ANHANG	XXVII
8.1 Abbildungsverzeichnis	xxvii
8.2 Tabellenverzeichnis	xxviii
8.3 Abkürzungsverzeichnis	xxix

Zusammenfassung

Das erstaunliche Selbsterneuerungspotential gesunder Haut wird durch eine Vielzahl von adulten Hautstammzellen ermöglicht. Wenn durch tiefe Verletzungen oder Erkrankungen die Selbsterneuerung gestört ist, können Narben oder chronische Wunden entstehen. Die derzeitigen Behandlungsmethoden sind immer noch unzureichend und der klinische Bedarf an effektiven wundheilungsfördernden Therapien zur Behandlung akuter und chronischer Wunden enorm. Aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit stellen Hautstammzellen ein sehr attraktives Instrument für die Wundtherapie mit autologen adulten Stammzellen dar. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer neuen Stammzellpopulation aus humanen Schweißdrüsen für einen möglichen klinischen Einsatz in der Hautwundheilung.

Neunzig Prozent der isolierten Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen (SGSCs) exprimierten *in vitro* das Protein Nestin. Die durchgeführte Charakterisierung der SGSCs umfasste die Optimierung und Standardisierung der Isolationsmethode aus humanen Hautbiopsien und die Anpassung der Kultivierungsbedingungen der gewonnenen adulten Stammzellpopulation. Zur Charakterisierung wurden die Proliferations- und Wachstumseigenschaften der SGSCs analysiert und ihr Expressionsprofil auf Gen- und Proteinebene untersucht. Hierbei wurde ein multipotentes Differenzierungspotential der SGSCs nachgewiesen. Dieses wurde mit anderen bereits etablierten Stammzelllinien verglichen. Dabei zeigten sich einige Gemeinsamkeiten in der Proteinexpression zu epidermalen Stammzellen (K7, K19, α 6) und mesenchymalen Knochenmarkstammzellen (CD9, CD29, CD44, CD105), aber auch Unterschiede im mesodermalen Differenzierungspotential der SGSCs, welche induziert lediglich in chondrogene Zelltypen differenzierten.

Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung der SGSCs konnte neben dem multipotenten Differenzierungspotential die Sekretion wundheilungsfördernder Zytokine nachgewiesen werden. Außerdem konnte die Kultivierbarkeit der nativen Schweißdrüsen in einem kollagenhaltigen Hautersatz gezeigt werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass humane Schweißdrüsen sich als leicht verfügbare und äußerst potente Stammzellquelle anbieten. Zusätzlich zum klinischen Einsatz für autologe Hautwundheilungstherapien könnten sie auch für andere klinische Anwendungen ein breites Potential eröffnen.

Abstract

The astonishing potential of healthy skin for self renewal is enabled by different adult stem cell populations. If the self renewal fails due to deep injuries or diseases, scars and chronic wounds can develop. The current methods of treatment are still deficient and the clinical need for effective wound healing therapies for extensive, acute and chronic wounds is tremendous. Due to the easy accessibility of skin these cells represent an attractive instrument for wound therapy with adult autologous stem cells. The aim of this work was the establishment of a new stem cell population of human sweat glands for a possible clinical application in skin wound healing.

Isolated sweat gland-derived stem cells (SGSCs) *in vitro* expressed the protein nestin in 90 % of the cells. The characterisation of these cells included the optimisation and standardisation of the sweat gland isolation method out of human skin biopsies and the modulation of the culture conditions for the isolated adult stem cells. In an extensive characterisation the proliferation and growth characteristics of the SGSCs were analysed and the expression profiles on gene- and protein level were determined. Furthermore, the multipotent differentiation potential of the SGSCs was verified and compared to other already established stem cell populations. Thereby some similarities within the protein expression could be proved to epidermal stem cells (K7, K19, α 6) and mesenchymal bone marrow stem cells (CD9, CD29, CD44, CD105). Differences in the mesodermal differentiation potential of the SGSCs, which could be induced merely into chondrogenic cell types, could also be detected.

With regard to a clinical application of the SGSCs, in addition to the multipotent differentiation potential, the secretion of wound healing stimulating cytokines could be demonstrated. Moreover, the opportunity to cultivate native sweat glands in a collagen containing skin substitute was shown.

These results identified human sweat glands as an easy accessible, very potent stem cells source. Besides the clinical application of the SGSCs for autologous skin wound healing therapies, they promise a broad clinical application for other stem cell therapies as well.

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden Körperzellen bezeichnet, die sich durch Teilung selbst erneuern können und die Fähigkeit haben in verschiedene Zelltypen oder Gewebe zu differenzieren. Je nach Art der Stammzelle und ihrer Beeinflussung haben sie das Potential, sich in jegliches Gewebe (embryonale Stammzelle) oder in festgelegte Gewebetypen (postembryonale Stammzellen) zu entwickeln (Zouboulis, 2009).

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Während der Embryonalentwicklung der Säuger entsteht aus der befruchteten Eizelle, der Zygote, ein vielzelliger, komplexer Organismus. Dabei nimmt die Potenz der Zellen von der totipotenten Eizelle über die pluripotenten embryonalen Stammzellen und die multipotenten adulten Stammzellen bis zu den terminal differenzierten somatischen Zellen stetig ab. Zu Beginn steht eine Phase der schnellen Zellteilungen, den Furchungsteilungen, zwischen denen es kein Zellwachstum gibt. Während der anschließenden Musterbildung entstehen die Körperachsen. Als Vorbereitung für die folgende Zelldifferenzierung und Gewebekonstruktion entwickeln sich die drei Keimblätter (Abb. 1).

Dabei entsteht das innere Endoderm, das äußere Ektoderm sowie das dazwischen liegende Mesoderm. Das Endoderm bildet den Darm mit den davon abgeleiteten Organen, wie z. B. Leber und Pankreas. Aus dem Mesoderm entwickeln sich Skelett, Muskulatur, Dermis und inneren Organe. Aus dem Ektoderm entstehen Nervensystem und Epidermis.

Embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESCs) werden aus der inneren Zellmasse eines frühen Embryonalstadiums, der sogenannten Blastozyste, wenige Tage nach der Befruchtung isoliert. Einerseits besitzen ESCs *in vitro* die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, wodurch sie in der Lage sind zahlreiche Zellteilungen zu durchlaufen und dabei nicht zu differenzieren (Adjaye *et al.*, 2005). Andererseits haben sie die Befähigung zur Differenzierung in alle Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter (Thomson *et al.*, 1998). Über das Schicksal der Zellen entscheidet dabei vor allem das biologische Milieu, in dem sich die Zellen befinden.

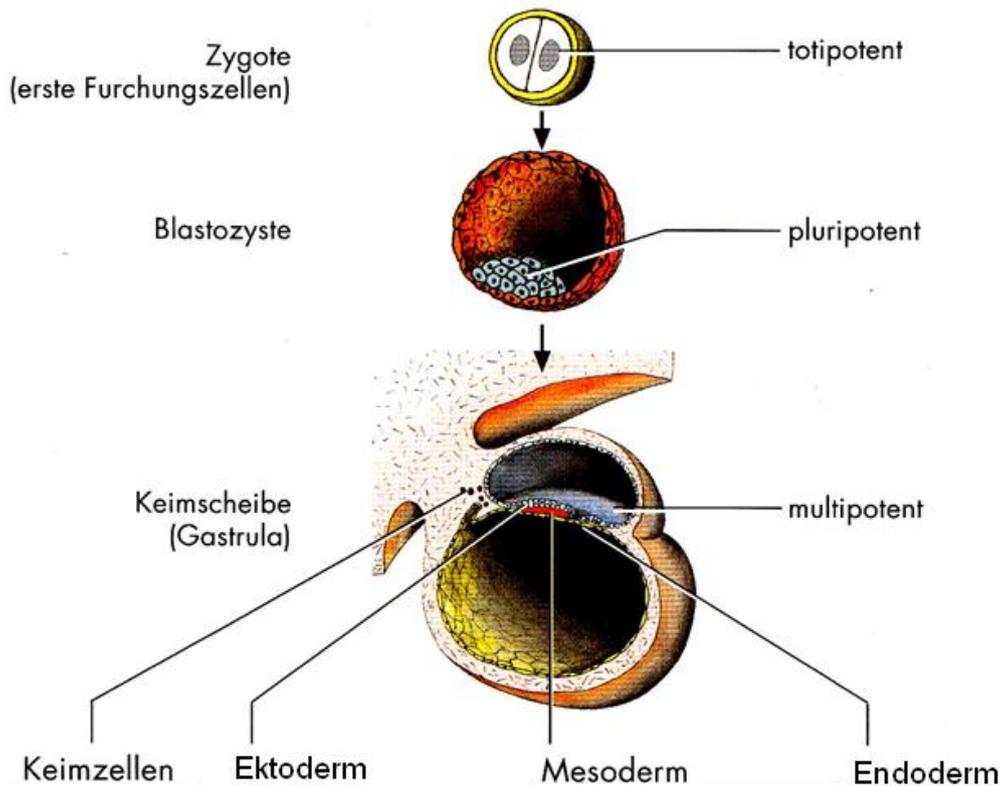


Abbildung 1: Die Embryonalentwicklung. Die totipotente Zygote entsteht bei der Befruchtung aus einer Eizelle und einem Spermium. Aus der Zygote entsteht durch die Furchungsteilungen die pluripotente Blastozyste. Diese besteht aus einer inneren Zellschicht, dem Embryoblast, und einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblast. Die pluripotenten Zellen des Embryoblast können als *embryonic stem cells* (ESCs) isoliert werden. Während der Gastrulation bilden sich in der Keimscheibe die 3 embryonalen Keimblätter; Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Veränderte Abbildung nach (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2007)

Zur Unterdrückung spontaner Differenzierung *in vitro* werden ESCs auf dem sogenannten Feeder-Layer aus teilungsinaktiven Fibroblasten kultiviert. Aufgrund einer hohen Aktivität des Enzyms Telomerase sind embryonale Zellen im undifferenzierten Zustand im Prinzip unbegrenzt vermehrbar. Theoretisch ist es also möglich, aus embryonalen Stammzellen jeden gewünschten Zelltyp in großer Anzahl zu erzeugen. Die Schwierigkeit dabei ist, die individuellen Bedingungen und Faktoren zu entschlüsseln, die eine embryonale Stammzelle zu der gewünschten Zelle differenzieren lassen. Probleme ergeben sich auch nach der Transplantation durch das starke Proliferationspotential embryonaler Stammzellen und der daraus resultierenden Tumorgefahr durch undifferenzierte Zellen (Reichmann, 2005). Nicht zuletzt ist ihre Herkunft, die menschliche Blastozyste, ethisch bedenklich. Zur Erforschung grundlegender Vorgänge in Stammzellen wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung oder Differenzierungsprozesse stellen ESCs jedoch ein konkurrenzloses Studienobjekt dar.

1.1.2 Adulte Stammzellen

Neben den embryonalen Stammzellen stellen adulte Stammzellen ein wichtiges und ethisch unproblematischeres Forschungsfeld dar. Aus adulten Stammzellen werden während der gesamten Lebensdauer des Organismus neue spezialisierte Zellen gebildet. Sie dienen somit der Gewebeerneuerung. Adulte Stammzellen sind in verschiedensten Organen, in einer Art Ruhezustand, zu finden. Sie können durch extrazelluläre Signale zur Teilung aktiviert werden. Dabei besteht ein sensibles Gleichgewicht zwischen der Selbsterneuerung und der Differenzierung. Entscheidend für dieses Gleichgewicht ist das biologische Milieu, welches die adulte Stammzelle umgibt, die sogenannte Nische. Diese besteht aus Nischenzellen, welche die Stammzellen vor proliferationsfördernden Signalen von außen schützen, die zu Tumoren führen können. Somit ist die Aufgabe der Nischenzellen ein Gleichgewicht zwischen der Stammzellruhe und der Aktivität herzustellen (Zouboulis, 2009). Auch wenn adulte Stammzellen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nicht mehr pluripotent sind, also nicht mehr in alle Gewebetypen differenzieren können, so stellen sie trotzdem eine alternative Quelle für die regenerative Zelltherapie dar. So werden seit den 1950er Jahren blutbildende Stammzellen des Knochens in der Behandlung von Leukämien und Lymphomen eingesetzt. Für diese Entdeckung wurde E. Donnell Thomas und Joseph E. Murray 1990 der Nobelpreis verliehen.

In den letzten Jahren konnten aus den unterschiedlichsten adulten Geweben wie Knochenmark, Fett, Leber, Pankreas, Speicheldrüse, Hoden, Darm, Nabelschnurblut, Zahnmark und Haut Stammzellen isoliert werden (Conrad *et al.*, 2008; Gorjup *et al.*, 2009; Gronthos *et al.*, 2002; Kruse *et al.*, 2006a; Lee *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 2006; Petschnik *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2010; Toma *et al.*, 2001).

In der Fraunhofer EMB ist es erstmals gelungen aus glandulären Geweben, wie dem Pankreas und den Speicheldrüsen, Stammzellen mit multipotenten Eigenschaften zu isolieren (Gorjup *et al.*, 2009; Kruse *et al.*, 2006b). Diese adulten Stammzellen zeigten *in vitro* ein Differenzierungspotential in unterschiedliche Zelltypen (Gorjup *et al.*, 2009; Guldner *et al.*, 2006; Kajahn *et al.*, 2008) und exprimierten Nestin, welches mit Proliferation und Zellplastizität assoziiert ist (Hoffman, 2007; Sahlgren *et al.*, 2001). Weil Stammzellen aus dem Pankreas für eine autologe Zelltherapie aufgrund ihrer Lokalisation ungeeignet sind, würden Stammzellen aus der Haut, aber speziell

aus Schweißdrüsen, einem weiteren exokrinen Drüsengewebe, eine gute Alternative darstellen. Nach der Isolation und der Charakterisierung von Stammzellen aus der Vollhaut (Kajahn *et al.*, 2008) und der Lokalisation von Nestin-positiven Zellen in den Schweißdrüsen (Tiede *et al.*, 2009) ist es gelungen diese Stammzellen zu isolieren und ihr multipotentes Differenzierungspotential nachzuweisen (Petschnik *et al.*, 2010).

Seit 2007 ist es ebenfalls möglich adulte Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) umzuwandeln (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Die iPS-Zellen gleichen nach der Behandlung in Aussehen, Oberflächenmarkern und genetischen Markern, den ESCs. Diese Eigenschaften können durch das virale Einbringen von DNA-Sequenzen der Transkriptionsfaktoren (TF) Oct4 (*octamer-binding transcription factor 4*), SOX2 (*sex determining region Y-box 2*), KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) und c-Myc induziert werden. Aufgrund der intensiven Forschung auf diesem Gebiet konnten in den letzten Jahren neue Methoden ohne Viren und DNA Transfer zur Herstellung der iPS-Zellen entwickelt werden (Robinton and Daley, 2012). Trotzdem ist der Einfluss der Reprogrammierung auf die Zellen immer noch nicht eindeutig geklärt und ihr Therapieeinsatz somit mehr als fraglich (Gore *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2011; Lister *et al.*, 2011).

Der Vorteil adulter Stammzellen gegenüber ESCs ist, dass sie aus vielen adulten Geweben für autologe Therapien gewonnen werden können und keine ethische Bedenklichkeit bei dessen Nutzung besteht. Des Weiteren konnte für adulte Stammzellen bisher kein malignes Verhalten *in vitro* und *in vivo* festgestellt werden (Bernardo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Schuleri *et al.*, 2007).

1.2 Haut und ihre Anhangsgebilde

Die Haut erstreckt sich über den gesamten Körper und stellt somit das größte Organ dar. Je nach Körpergröße entspricht sie einer Fläche von 1,5 bis 1,8 m². Die Funktion der Haut besteht im Schutz vor mechanischen, thermischen und chemischen Noxen. Sie absorbiert UV-Strahlen, ist eine Barriere für Bakterien und Viren, reguliert den Wasserhaushalt und die Körpertemperatur (Schwitzen, Austrocknungsschutz), bietet Kälteschutz (Fettgewebe) und verfügt über Rezeptoren der Sinneswahrnehmung für Druck, Vibration, Schmerz und Temperatur.

1.2.1 Aufbau der Haut

Die Haut lässt sich in drei Bereiche gliedern, die Epidermis, die Dermis und die Subkutis (Abb. 2).

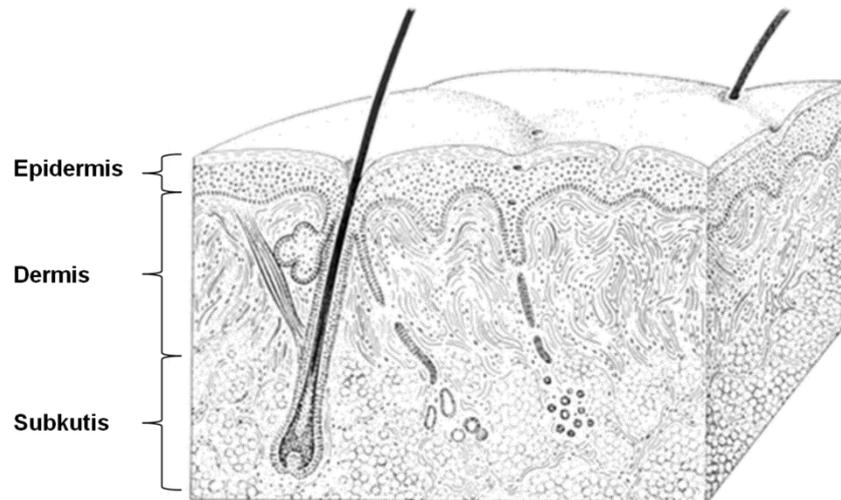


Abbildung 2: Schichtung der Haut. Die Haut besteht aus drei Schichten; der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Veränderte Abbildung nach (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2000)

Die Epidermis leitet sich vom Ektoderm, die Dermis und die Subkutis hingegen vom Mesoderm ab. Melanozyten wandern von der Neuralleiste in die Epidermis ein, während die antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen aus dem Blut und letztlich aus Vorläuferzellen des Knochenmarks stammen (Lüllmann-Rauch, 2009). Haare, Nägel, Talg-, Schweiß- und Milchdrüsen sind ausdifferenzierte ektodermale Epithelknospen, die in das darunterliegende Mesoderm einsprossen.

1.2.1.1 Epidermis

Die Epidermis, ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, ist die äußerste Schicht der Haut und besteht überwiegend aus Keratinozyten. Diese durchlaufen die epidermalen Schichten bei ihrer terminalen Differenzierung von basal nach apikal (Abb. 3). Das einlagige *Stratum basale* sitzt der Basalmembran auf und besteht aus epidermalen Stammzellen (*epidermal stem cells*, EpiSCs) und Tochterzellen. Die Tochterzellen können als teilungsfähige Klone im *Stratum basale* verbleiben oder in die Differenzierung übergehen. Im *Stratum basale* befinden sich auch Melanozyten, die eine dendritische Form aufweisen und Melanin an die Keratinozyten übertragen. Durch Ausbildung von Desmosomen an den Zellfortsätzen formen die Keratinozyten ein stabiles Netzwerk.

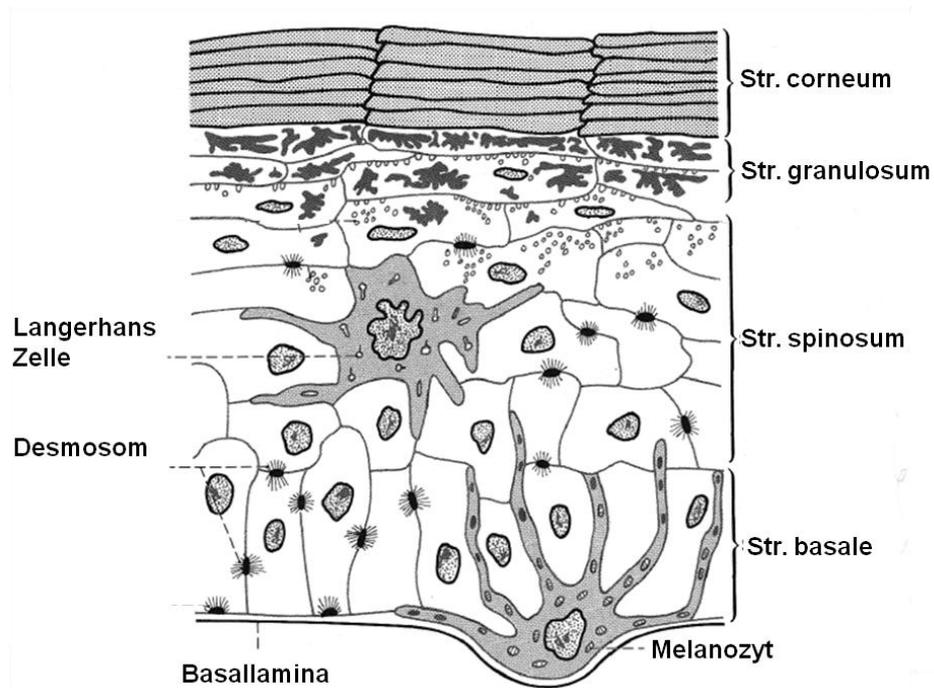


Abbildung 3: Schichtung der Epidermis. Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel und besteht überwiegend aus Keratinozyten. Diese durchlaufen die epidermalen Schichten bei ihrer terminalen Differenzierung von basal nach apikal. Das einlagige *Stratum basale* sitzt der Basalmembran auf. Darin befinden sich Melanozyten, welche Melanin an die Keratinozyten übertragen. Durch die Ausbildung von Desmosomen formen die Keratinozyten ein stabiles Netzwerk. An das *Stratum basale* schließt sich das mehrschichtige *Stratum spinosum* an. In dieser Schicht befinden sich Langerhans-Zellen, welche an der Immunabwehr beteiligt sind. Im *Stratum granulosum* lösen sich die Zellkerne und Zellorganellen auf, es folgt eine Dehydrierung und die Plasmamembran wird durch eine Proteinhülle ersetzt. Diese Veränderungen sind im *Stratum corneum* abgeschlossen. Veränderte Abbildung nach (Bennighoff, 1985)

An das *Stratum basale* schließt sich das mehrschichtige *Stratum spinosum* an. In dieser Schicht befinden sich auch die Langerhans-Zellen, welche sich an der Immunabwehr beteiligen (Junquiera and Carneiro, 1991; Montagna *et al.*, 1992). Im *Stratum granulosum* verschwinden die Zellkerne und Zellorganellen, es folgt eine Dehydrierung und die Plasmamembran wird durch eine Proteinhülle ersetzt. Dieser Verhornungsprozess führt zu starren und immobilen Zellen, die fest miteinander verbunden sind. Diese Veränderungen sind im *Stratum corneum* abgeschlossen. Hier heißen die kernlosen Zellen Korneozyten und sind plättchenartig ineinander verzahnt (Bennighoff, 1985).

1.2.1.2 Dermis

Die Dermis ist eine fibroelastische Schicht aus kollagenem Bindegewebe und unterteilt sich in die retikuläre und papilläre Dermis. Die papilläre Dermis ist stark durch Wölbungen, den sogenannten Papillen, mit der Epidermis verzahnt. Die

Dermis besteht hauptsächlich aus Fibroblasten und Bindegewebsfasern aus Elastin und Kollagen. Diese Matrix ist reich an Hyaluronan und Proteoglykanen, die wasserbindende Eigenschaften besitzen und somit den Turgor der Haut bestimmen. Weiterhin enthält die Dermis Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen zur Immunabwehr. Außerdem befinden sich in der Dermis zahlreiche Rezeptororgane, Nerven und Gefäße (Matoltsy, 1986). Von der Dermis ziehen bindegewebige Septen in das darunterliegende Fettgewebe und verankern es so an den tiefen Bindegewebsfaszien und an der Knochenhaut (Bennighoff, 1985). Die Hautanhangsgebilde reichen bis in die Dermis und durch sie hindurch.

1.2.1.3 Subkutis

Die an die Dermis anschließende Subkutis besteht aus einem lockeren Bindegewebe und enthält viele Fettzellen. Die Subkutis sorgt für eine lockere Verbindung zwischen der Haut und den darunterliegenden Geweben. An der Grenzfläche zwischen Dermis und Subkutis sitzen die Haarwurzeln und die Schweißdrüsen. Die Subkutis enthält weiterhin die in die oberen Hautschichten laufenden Gefäße und Nerven.

1.2.2 Drüsen der Haut

Aus dem Epithel der Haut gehen eine Reihe von Drüsen sehr unterschiedlicher Bauweise und Funktion hervor. Im Folgenden werden die Talg- und die Milchdrüse kurz erläutert. Anschließend wird die Schweißdrüse näher charakterisiert.

Die Talgdrüsen sind azinäre, holokrine Drüsen, welche in den Haarfollikel münden. Sie bilden Talg, welcher die Haut und das Haar geschmeidig macht. Er ist wasserabstoßend und keimwachstumshemmend. Von der Keimschicht werden ständig neue Zellen gebildet. Diese differenzieren und werden bei der Sekretion abgestoßen (Bennighoff, 1985). Die Talgdrüsenanlage entsteht während der Entwicklung des Haarfollikels (Bargmann, 1977). Die Milchdrüse, entwickelt sich aus den Anlagen apokriner Drüsen (Bargmann, 1977; Schiefferdecker, 1922). Sie entstehen im Bereich der Milchleiste, einem Epithelstrang, der beiderseits von der Achsel bis zur Leistenbeuge zieht. Bis auf das thorakale Paar bilden sich alle Anlagen zurück. Aus den verbleibenden Epithelknospen sprossen Milchgänge in die Subkutis. Während der Laktation werden Fetttröpfchen mit einer Zytoplasmahülle von der Zelloberfläche abgeschnürt. Im Laufe der Laktation verbrauchte Epithelzellen gehen in das Sekret über und werden wieder ersetzt (Bargmann, 1977).

1.2.2.1 Evolutionäre und embryonale Entwicklung der Schweißdrüsen

Das Vorkommen von Schweißdrüsen in der menschlichen Haut ist seit Mitte des letzten Jahrhunderts bekannt. Die allgemein übliche Einteilung in ekkrine und apokrine Schweißdrüsen wurde von Schiefferdecker vorgenommen (Schiefferdecker, 1922). Der menschliche Organismus besitzt zwei Typen von Schweißdrüsen. Zum einen die in den Haarfollikel mündenden apokrinen Schweißdrüsen, welche vorwiegend in der Achsel und dem Perigenitalbereich lokalisiert sind. Zum anderen die ekkrinen Schweißdrüsen, welche an die Hautoberfläche münden und über die gesamte Körperoberfläche verteilt sind (Abb. 4) (Bennighoff, 1985). Zusätzlich wurden von Sato und Kollegen die apoekkrinen Drüsen beschrieben, eine Mischform, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll (Sato *et al.*, 1987).

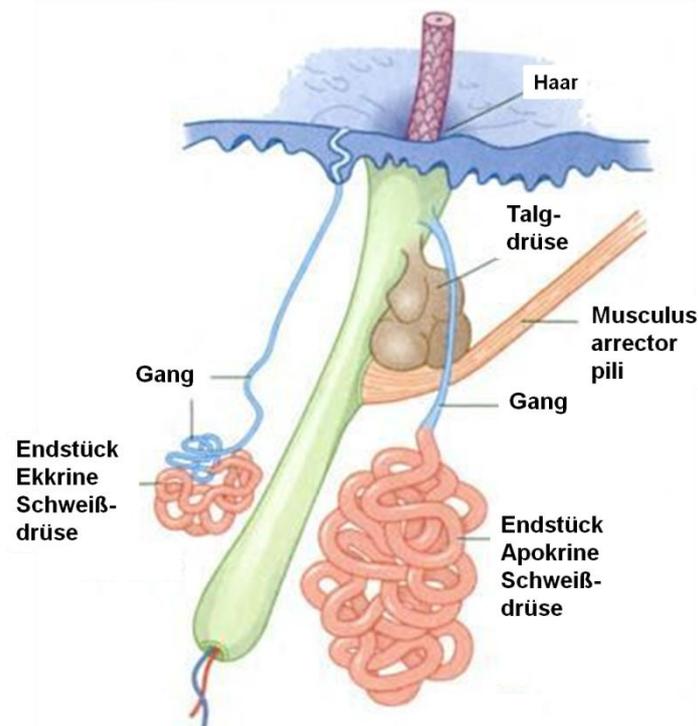


Abbildung 4: Die Schweißdrüsen und der Haarfollikel. In der humanen Haut gibt es zwei Typen von Schweißdrüsen, die in den Haarfollikel mündenden apokrinen Schweißdrüsen und die an die Hautoberfläche mündenden ekkrinen Schweißdrüsen. Sie bestehen jeweils aus einem Gang und einem geknäuelten Endstück. Veränderte Abbildung nach (Lüllmann-Rauch, 2009)

Die apokrinen Schweißdrüsen sind evolutionär die Älteren. Die ekkrinen Schweißdrüsen sind eine spätere Bereicherung, da sie erstmalig bei Primaten auftraten (Bargmann, 1977; Bennighoff, 1985). Bei den ekkrinen Schweißdrüsen sind die Palmoplanardrüsen die Ältesten. Diese dienen der Befeuchtung der Oberfläche für eine bessere Haftung. Am jüngsten sind die thermoregulatorischen ekkrinen

Schweißdrüsen (Montagna and Parrakkal, 1974). Ekkrine Schweißdrüsen am gesamten Körper sind nur bei Menschen und höheren Primaten vertreten. Palmoplanar sind ekkrine Schweißdrüsen aber auch bei anderen Säugetieren vorhanden. Die Anlagen der ekkrinen Schweißdrüsen bestehen aus soliden Epithelsprossen, die von der Basis der Epidermis durch die Dermis bis in die Subkutis hineinwachsen. Die apokrinen Schweißdrüsen gehen aus Anschwellungen der Haaranlagen hervor. Aus diesen wächst ein am Ende verdickter Epithelstrang durch die Dermis bis in die Subkutis (Bargmann, 1977). Anschließend bildet sich das Lumen aus, welches sich in den Haarfollikel öffnet (Braun-Falco and Rupec, 1968). Im Kindesalter sind beide Schweißdrüsenarten sehr ähnlich. Ekkrine Schweißdrüsen nehmen ihre Funktion kurz nach ihrer Ausreifung auf (Kurosumi *et al.*, 1984). Apokrine Schweißdrüsen bilden erst in der Pubertät ihre charakteristischen Merkmale aus (Braun-Falco and Rupec, 1968).

1.2.2.2 Ekkrine Schweißdrüsen

Die ekkrinen Schweißdrüsen kommen in unterschiedlicher Dichte überall in der menschlichen Haut vor. Besonders häufig sind sie im Bereich von Stirn, Handteller und Fußsohle vertreten. Ihr saures Sekret hemmt das Bakterienwachstum und dient der Wärme und Ionenabfuhr. Die einfach tubulären, ekkrinen Schweißdrüsen bestehen aus einem langen Gang, welcher aus einem zweischichtigen kubischen Epithel besteht (Abb. 5) (Bennighoff, 1985). Das Endstück besteht aus einem einschichtigen Epithel, bei dem sich zwischen Basalmembran und Epithelzellen, Myoepithelzellen befinden. Es gibt helle und dunkle Epithelzellen. Die hellen sind größer und sitzen meist auf den Myoepithelzellen. Sie enthalten wenig Ribosomen und bilden ein wässriges Sekret, welches an das Lumen abgegeben wird (ekkrine Sekretion). Zwischen den hellen Zellen treten interzelluläre Sekretkanälchen auf. Darüber sitzen dunkle Epithelzellen, die mehr Ribosomen und viele Sekretgranula enthalten. In den Endstücken wird von den hellen Epithelzellen ein Primärschweiß sezerniert. Dazu erfolgt ein aktiver Natriumionentransport aus dem Extrazellularraum mit nachfolgender passiver Diffusion von Wasser. Der isotone Primärschweiß wird im Gang teilweise wieder resorbiert. Da aber mehr Natrium als Wasser resorbiert wird, resultiert ein hypotoner Schweiß (Bennighoff, 1985).

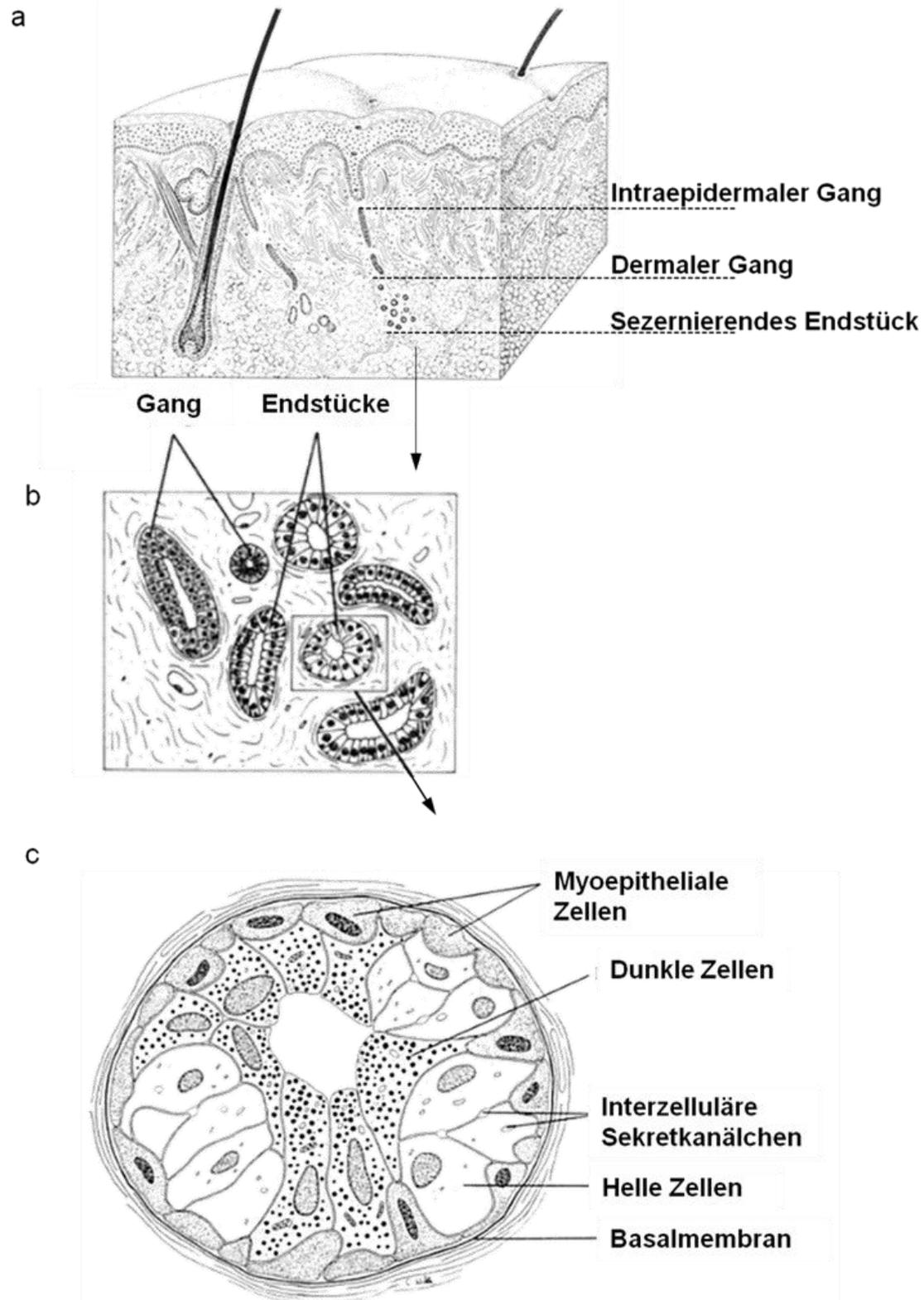


Abbildung 5: Aufbau der ekkrinen Schweißdrüsen. a) Im Querschnitt der humanen Haut lassen sich die Anhangsgebilde gut erkennen. Die ekkrinen Schweißdrüsen bestehen aus dem intraepidermalen Gang, dem dermalen Gang und dem sezernierenden Endstück. b) In einer vergrößerten Darstellung des Querschnitts einer ekkrinen Schweißdrüse können Gang und sezernierende Endstücke unterschieden werden. c) Im Querschnitt eines Endstückes sind dunkle und helle Zellen, sowie Myoepithelzellen zu erkennen. Zwischen den hellen Zellen befinden sich interzelluläre Sekretkanälchen. Umgeben sind die Epithelzellen von einer Basalmembran. Veränderte Abbildung nach (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2000)

1.2.2.3 Apokrine Schweißdrüsen

Die apokrinen Schweißdrüsen treten meist zusammen mit Haaren auf und werden erst mit der Pubertät aktiv. Man findet sie in der Achsel und dem Perigenitalbereich. Die verzweigten Drüsen haben weite, alveoläre Endstücke bis in die Subkutis und sind größer als die ekkrinen Schweißdrüsen (Abb. 6).

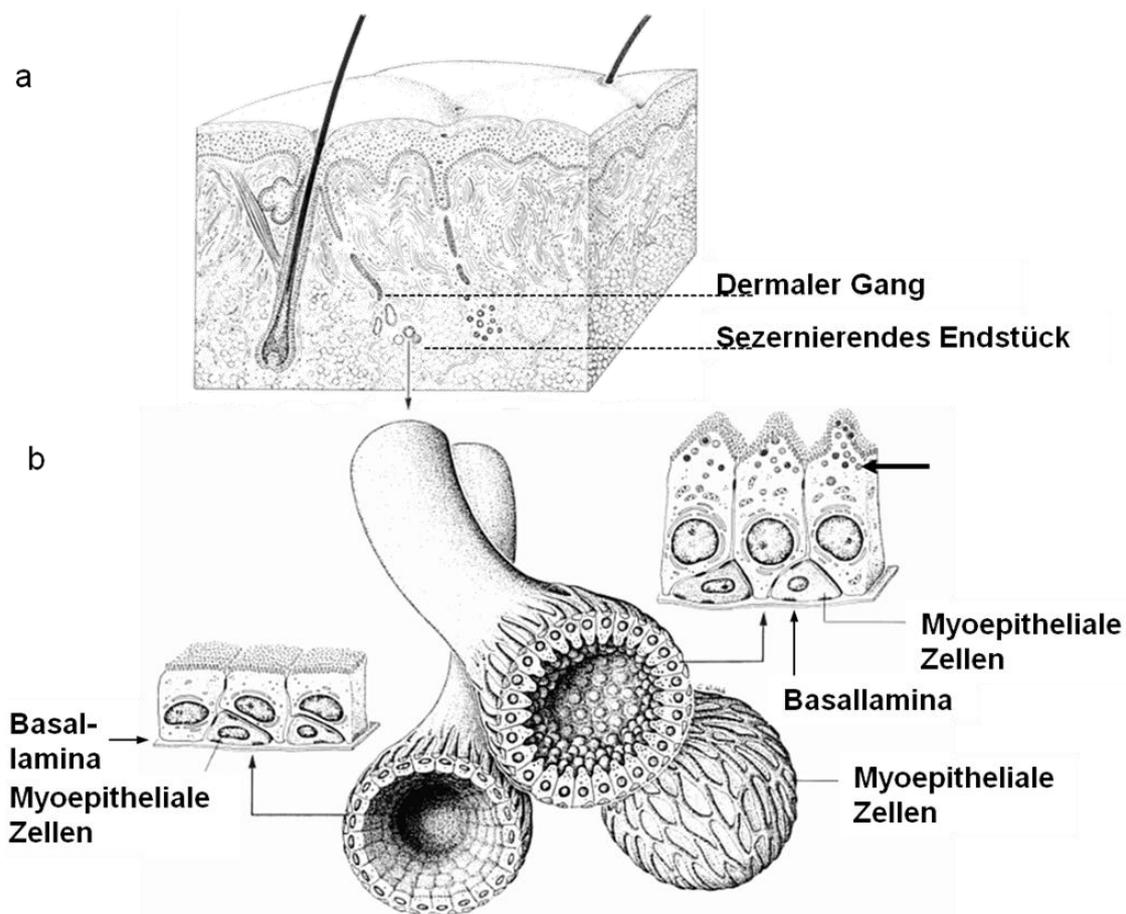


Abbildung 6: Aufbau der apokrinen Schweißdrüsen. a) Im Querschnitt der humanen Haut lassen sich die Anhangsgebilde gut erkennen. Die apokrinen Schweißdrüsen unterteilen sich in einen dermalen Gang, welcher in den Haarfollikel mündet, und das sezernierende Endstück. b) In Ruhe besitzt das sezernierende Endstück ein niedriges, organellenarmes Epithel (links), bei der Sekretion vergrößern sich die Zellen (rechts) und schnüren apikal granulohaltige Zytoplasmateile (siehe Pfeil) ab. Basal liegen Myoepithelzellen, die die sezernierenden Endstücke umhüllen. Veränderte Abbildung nach (Rohen and Lütjen-Drecoll, 2000)

Der relativ gerade Gang der apokrinen Schweißdrüse mündet in den Haarfollikel. Das Epithel der Endstücke ist einschichtig und die Sekretionszellen besitzen viele Mitochondrien und Lysosomen (Bargmann, 1977). Die apokrine Sekretion erfolgt durch Abschnürung und Dekapitierung der apikalen Membran, wo sich die Sekretgranula ansammeln (Ackermann, 1997; Aumüller *et al.*, 1999; Inoue, 1979; Kurosumi *et al.*, 1984). Das Epithel ist je nach Funktionszustand der apokrinen

Schweißdrüse sehr unterschiedlich gestaltet, von flach bis hochprismatisch. Zwischen dem Epithel und der Basalmembran befinden sich viele Myoepithelzellen, welche dichter gelagert sind als in den ekkrinen Schweißdrüsen (Bargmann, 1977). Der apokrine Gang ist im Aufbau nicht von dem ekkrinen Gang zu unterscheiden (Ackermann, 1997). Die apokrinen Drüsen haben beim Menschen keine thermische sondern eine pheromonische Bedeutung (Bennighoff, 1985).

1.2.3 Haare

Haare sind Keratinfäden, die zyklisch und asynchron aus den Haarfollikeln entstehen. Haare erfüllen beim Menschen nur eine geringfügige thermische und keine mechanische Schutzfunktion. Ihre Hauptaufgabe ist die Sinneswahrnehmung, die durch ein dichtes Netz von Nervenfasern gewährleistet wird (Bennighoff, 1985). Man unterscheidet Vellus- und Terminalhaare. Vellushaare bedecken den gesamten Körper und sind sehr viel feiner als Terminalhaare. Terminalhaare befinden sich am Kopf, den Wimpern, den Augenbrauen, dem Bart, der Achsel, im Schambereich, dem äußeren Gehörgang und dem Naseneingang (Ackermann, 1997).

Die Haaranlage entsteht während der embryonalen Entwicklung aus einer Epidermisverdickung, dem Haarkeim, der von der Basis bis ins Mesenchym vordringt (Abb. 7). In unmittelbarer Nachbarschaft entwickelt sich durch Zellteilungen eine Mesenchymverdichtung in der Dermis. Diese Zellen bilden die Vorläufer der dermalen Papille. Der Haarkeim wächst zum Haarzapfen aus und umschließt glockenartig die dermale Papille. Während der Ausbildung sprossen seitliche Epithelwulste hervor, die Anlagen für Talgdrüse, *Musculus arrector pili* und apokrine Schweißdrüse. Der größte Teil des Haarzapfens bildet die äußere Haarwurzelscheide. Die Bildung des Haarschaftes und der inneren Haarwurzelscheide geht von der Haarmatrix aus. Der Haarschaft schiebt sich innerhalb der inneren Wurzelscheide und mit ihr zusammen bis in den oberen Teil des Haarzapfens. Dort hat sich durch den Zerfall verhornter Zellen der Haarkanal gebildet (Bargmann, 1977; Hardy, 1992).

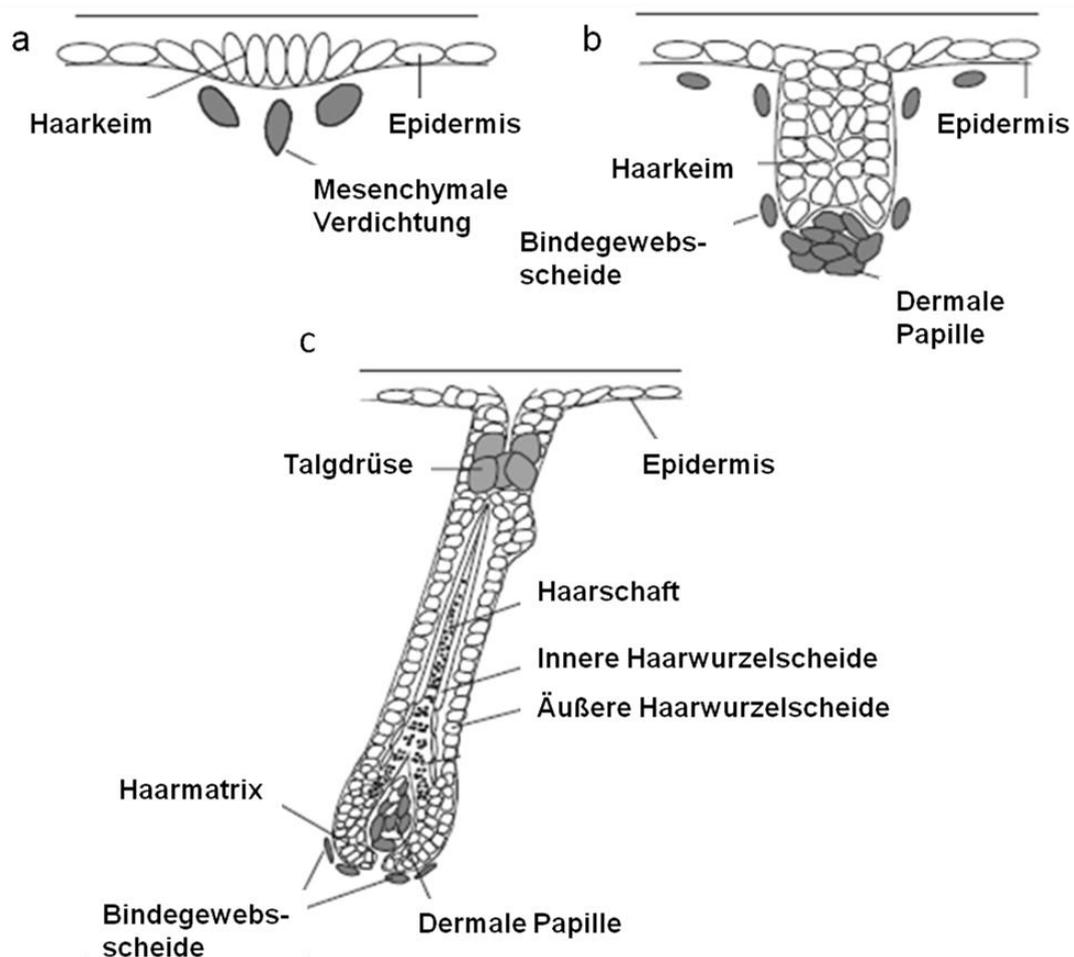


Abbildung 7: Die embryonale Haarentwicklung. a) Die Haaranlage entsteht aus einer Epidermisverdickung, dem Haarkeim. Durch Zellteilungen entwickelt sich eine Mesenchymverdichtung in der Dermis. b) Der Haarkeim wächst zum Haarzapfen aus und umschließt glockenartig die dermale Papille. c) Der größte Teil des Haarzapfens bildet die äußere Haarwurzelscheide. Die Bildung des Haarschaftes und der inneren Haarwurzelscheide geht von der Haarmatrix aus. Veränderte Abbildung nach (Botchkarev *et al.*, 1999)

Haare werden zyklisch gebildet. Der Lebenszyklus eines Haares setzt sich aus dem Anagen (Wachstumsphase), dem Katagen (Rückbildungsphase) und dem Telogen (Ruhephase) zusammen (Abb. 8) (Ebling, 1976; Hardy, 1992). Nach der Wachstumsphase setzt die Rückbildungsphase ein. In der Rückbildungsphase stellt die Haarmatrix ihre Zellproduktion ein, das Haar löst sich von der dermalen Papille und der Haarfollikel verkürzt sich. Nach der anschließenden Ruhephase beginnt die Wachstumsphase von Neuem. Neues Epithel migriert über die verbliebene dermale Papille, woraus sich ein neues Haar zu bilden beginnt. Während des Wachstums drängt es das alte Haar heraus (Bennighoff, 1985). Die Hautdicke variiert dabei mit den Haarzyklen.

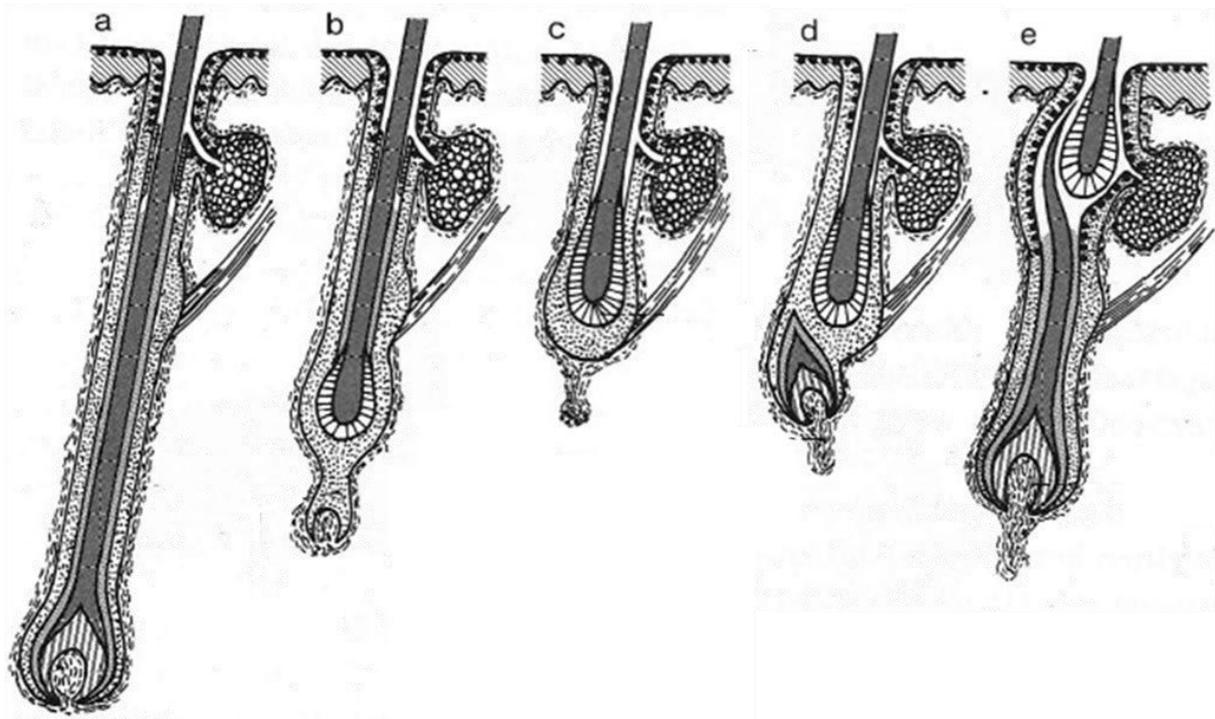


Abbildung 8: Der Haarzyklus. a) Das Anagen stellt die Wachstumsphase des Haares dar. b) Im Katagen, der Rückbildungsphase, löst sich das Haar von der dermalen Papille und der Haarfollikel verkürzt sich. c) Nach dem Telogen, der Ruhephase, beginnt die Wachstumsphase von Neuem. d) Neues Epithel migriert über die verbliebene dermale Papille, woraus sich ein neues Haar zu bilden beginnt. e) Während des Wachstums drängt es das alte Haar heraus. Veränderte Abbildung nach (Bennighoff, 1985)

1.2.4 Stammzellquellen der Haut

Ein immer wieder auftretender Marker bei der Identifikation von Stammzellenquellen der Haut ist **Nestin** (Abb. 9). Nestin ist ein Intermediärfilament, welches in neuronalen Stammzellen exprimiert wird (Fu *et al.*, 2008; Yaworsky and Kappen, 1999).

Da Nestin allerdings auch in anderen adulten Stammzellen detektiert werden konnte (Hoffman, 2007; Toma *et al.*, 2005; Wiese *et al.*, 2004), wurde seine Expression als genereller Marker für adulte Stammzellen anerkannt. In humaner Haut wird Nestin vor allem im Mesenchym des Haarfollikels, den Talgdrüsen und den Schweißdrüsen (Tiede *et al.*, 2009) exprimiert.

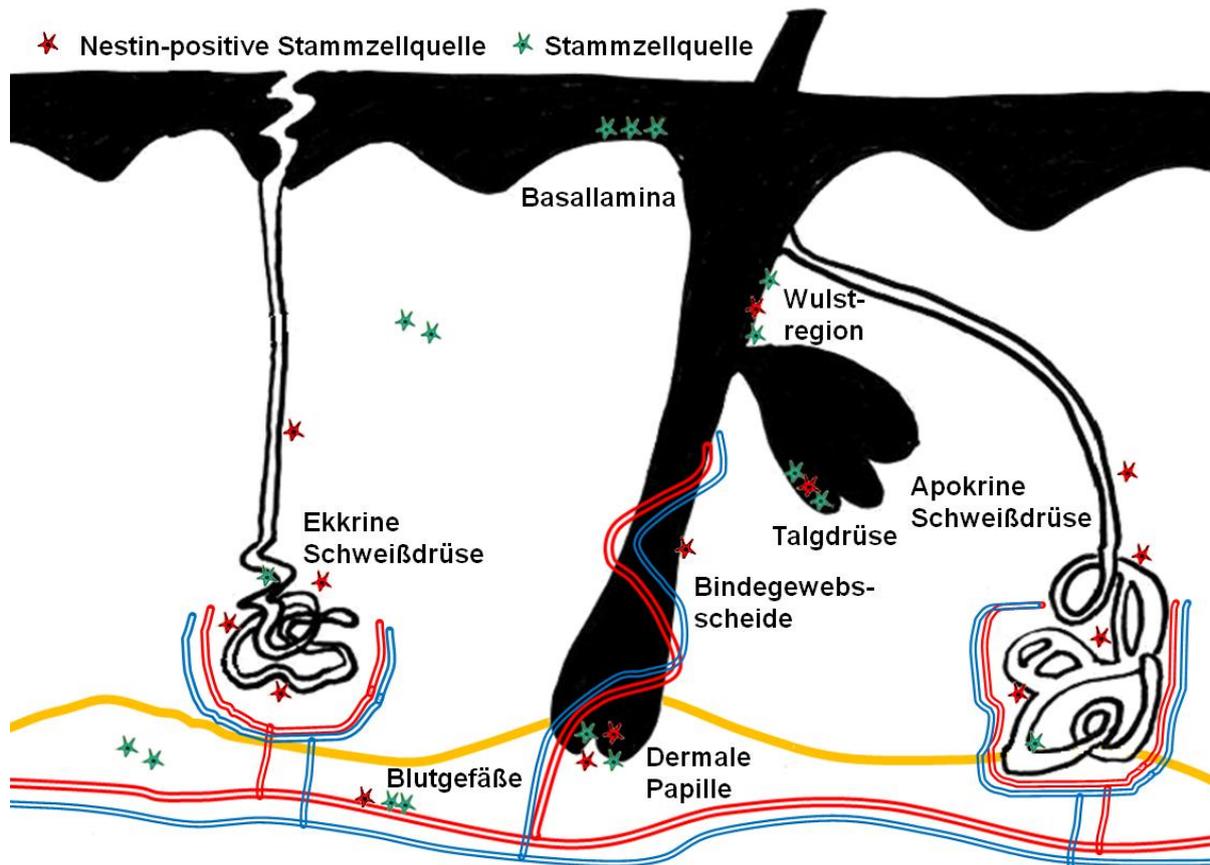


Abbildung 9: Stammzellquellen der Haut. Dargestellt sind die Stammzellquellen der Haut von der Epidermis, über die Dermis bis zur Subkutis. Einige Stammzellen dieser Stammzellquellen exprimieren Nestin (rot markierte Zellen), wie die Stammzellen der Wulstregion, der Bindegewebsscheide, der Talgdrüse, der dermalen Papille, des Schweißdrüsenmesenchyms und der Blutgefäße. Andere Stammzellen der Stammzellquellen der Haut exprimieren kein Nestin (grün markierte Zellen).

Die Epidermis ist ein sich ständig regenerierendes Epithel. Diese lebenslang anhaltende Erneuerung beruht auf der Existenz von adulten epidermalen Stammzellen. In der Epidermis unterscheidet man zwischen Stammzellen der interfollikulären Epidermis, des Haarfollikels mit der Wulstregion und der Talgdrüse. Stammzellen der interfollikulären Epidermis befinden sich an der Basallamina. Die Existenz von Stammzellen im Haarfollikel ist für die Regeneration des Anagenhaarfollikels erforderlich. Stammzellen des Haarfollikels sind, zusätzlich zum Haarfollikelumbau, an der epidermalen Regeneration beteiligt, wenn die Hautintegrität beschädigt wird (Ito *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2000). Die Wulstregion befindet sich zwischen der Einmündung des Ausführungsgangs der Talgdrüse und der Ansatzstelle des *Musculus arrector pili*. Stammzellen der Wulstregion sind in der Lage den Haarfollikel, die interfollikuläre Epidermis und die Talgdrüse zu generieren (Oshima *et al.*, 2001). Die stetige Differenzierung der Talgdrüsenzellen setzt

ebenfalls eine Zellquelle mit Stammzeleigenschaften voraus (Fuchs and Horsley, 2008; Watt *et al.*, 2006). Sollte der Haarfollikel oder die Talgdrüse untergehen, übernimmt jeweils die andere Stammzellpopulation den Wiederaufbau (Selleri *et al.*, 2006).

Die Existenz von Stammzellen in der Dermis ist unumstritten, aber deren Lokalisation ist noch nicht vollständig erforscht. Die zyklische Regeneration des Haarfollikels ist von einer exakten Interaktion eines spezialisierten Mesenchyms mit dem epithelialen Anteil des Haarfollikels abhängig. Dabei werden wichtige Bestandteile, wie die neuen Blutgefäße, von dermalen Stammzellen der follikulären Bindegewebsscheide gebildet (Jahoda *et al.*, 2003). Diese Zellen exprimieren Nestin (Kloepper *et al.*, 2008; Tiede *et al.*, 2009). Nestin wird auch in der Haarpapille exprimiert, wo es ebenfalls mesenchymale Stammzellen markiert (Hunt *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2006a; Tiede *et al.*, 2009). In der Dermis befinden sich zudem undifferenzierte dermale Zellen, die sogenannten Fibrozyten. Diese sind Progenitorzellen der Fibroblasten. Sie emigrieren aus dem Knochenmark und infiltrieren die Dermis während der Wundheilung (Bucala *et al.*, 1994; Quan *et al.*, 2004). Den residenten Endothelzellen kommt ebenfalls eine wichtige Bedeutung bei der Regeneration von Endothelschäden zu (Bluff *et al.*, 2007; Grenier *et al.*, 2007). Nestin wird während der Angiogenese sowohl von Endothelzellen, den glatten Muskelzellen als auch den Perizyten exprimiert (Aihara *et al.*, 2004; Mokry *et al.*, 2004; Mokry *et al.*, 2008). Eine weitere Stammzellquelle in der Dermis sind die aus der Neuralleiste immigrierten Neuralleistenzellen (NLZ) welche unter anderem im Mesenchym des Haarfollikels nachgewiesen werden können und ebenfalls Nestin exprimieren (Fernandes *et al.*, 2004; Sieber-Blum and Grim, 2004; Wong *et al.*, 2006).

Auch das Fettgewebe beinhaltet multipotente Stammzellen (Gimble *et al.*, 2007; Zuk *et al.*, 2002), die eine Rolle in der Wundheilung spielen (Ebrahimian *et al.*, 2009).

1.3 Regeneration der Haut

Aufgrund der enormen Bedeutung der Haut für den Organismus, besitzt sie die Fähigkeit, sich sehr schnell und effektiv selbst zu regenerieren. Diese erstaunliche Fähigkeit zur Selbsterneuerung wird durch eine Vielzahl von adulten Hautstammzellen ermöglicht. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit der Haut stellen diese Zellen ein sehr attraktives Instrument in der Wundtherapie mit autologen adulten Stammzellen dar.

1.3.1 Phasen der Hautwundheilung

Nach einer Verletzung der Haut schwemmt das Blut Keime und Schmutz aus der Wunde. Im physiologischen Wundheilungsprozess werden drei Phasen unterschieden, die zeitlich und räumlich überlappen (Abb. 10).

In der Entzündungsphase wird zur Blutstillung die Gerinnungskaskade aktiviert. Ein keilförmiger Pfropf entsteht aus roten Blutkörperchen und Blutplättchen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung einer Fibrinmatrix. Währenddessen werden von den ortsansässigen Thrombozyten verschiedene Zytokine ausgeschüttet (*transforming growth factor β* (TGF β), *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *insulin-like growth factor 1* (IGF1)) (Martin, 1997; Smola *et al.*, 2001). Die Permeabilität der Kapillaren steigt und es immigrieren neutrophile Granulozyten und sezernieren proinflammatorische Zytokine (Interleukin 1 (IL 1), IL 6, IL 8 und *tumor necrosis factor α* (TNF α)).

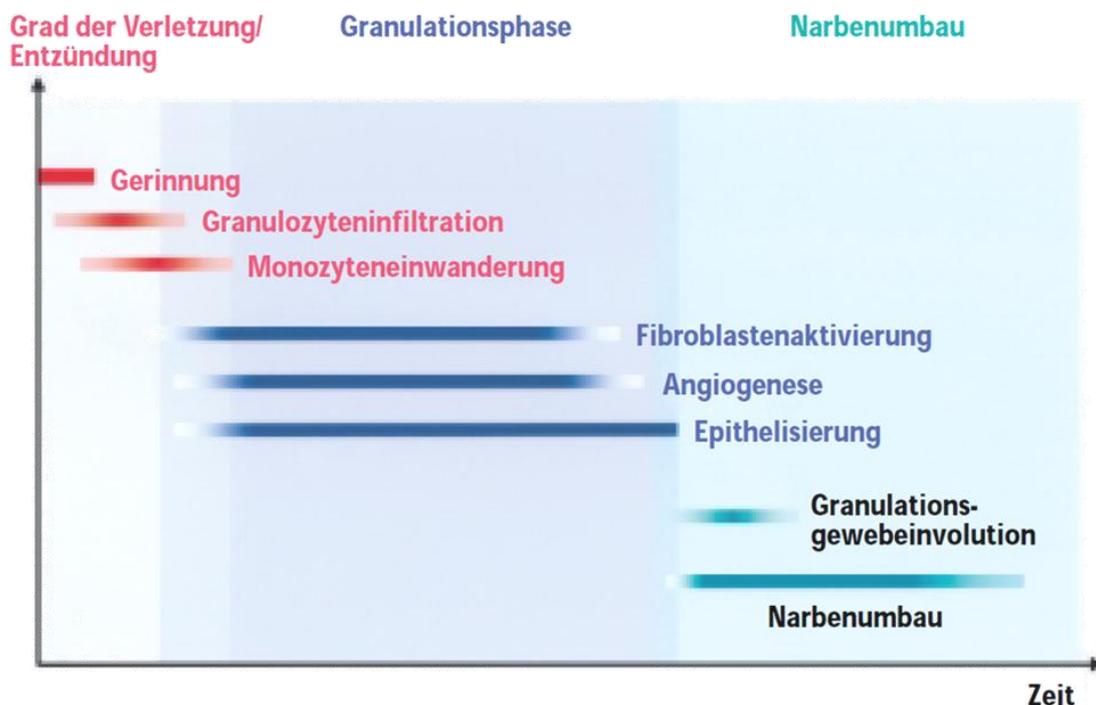


Abbildung 10: Phasen der Wundheilung. Im physiologischen Wundheilungsprozess werden drei Phasen unterschieden, die zeitlich und räumlich überlappen; die Entzündungsphase (rot), die Granulationsphase (blau) und die Phase des Narbenbaus (türkis). Abbildung nach (Smola *et al.*, 2001)

Eingewanderte Monozyten reifen zu Makrophagen, phagozytieren Bakterien und Gewebetrümmer und führen zur Aktivierung von Fibroblasten und Keratinozyten durch die Sekretion von IGF1, TGF α und β , FGF und PDGF (Hubner *et al.*, 1996; Valluru *et al.*, 2011). In der Granulationsphase (ab dem 3.-6. Tag) werden neue

Gefäße von immigrierten Endothelzellen gebildet und gewährleisten die Versorgung der zahlreich eingewanderten Zellen. Fibroblasten sezernieren Kollagenproteine, welche sich zu kollagenhaltigen Fibrillen (erst Typ III) vernetzen. Diese ersetzen die Fibrinmatrix, welche durch Proteasen abgebaut wird. Durch die einwandernden Fibroblasten werden die Keratinozyten über IGF1, FGF, TGF β , PDGF und EGF aktiviert. Sie wandern von den Wundrändern ein und bilden eine neue Basalmembran unterhalb des Pfropfs. Damit beginnt die Phase des Narbenumbaus (ab dem 7.-10. Tag), in der das Granulationsgewebe abgebaut und durch neues Gewebe ersetzt wird. Diese Phase kann bis zu einem Jahr andauern. Das Kollagen Typ III wird durch Fibroblasten abgebaut und durch Kollagen Typ I ersetzt. Die reichlich gebildeten Blutgefäße werden wieder zurückgebildet. Weiterhin gehen viele der eingewanderten Zellen zugrunde. Wenn diese empfindlichen Phasen der Wundheilung gestört sind kommt es zu Narben oder chronischen Wunden. Charakteristisch für narbiges Gewebe ist das Fehlen der Hautanhangsgebilde.

1.3.2 Regenerative Therapien in der Wundheilung

Ziel regenerativer Therapien ist im Wesentlichen, die zum Erliegen gekommenen körpereigenen Reparaturvorgänge wieder zu aktivieren oder wenn nötig durch Ersatzstoffe möglichst funktionell wiederherzustellen.

Der klinische Bedarf an effektiven wundheilungsfördernden Therapien zum Verschluss bzw. zur Abdeckung von großflächigen, akuten und chronischen Wunden ist enorm. Da die Wundheilung im Laufe des Lebens immer mehr verzögert oder gestört ist, ist aufgrund des zunehmenden Lebensalters der Bevölkerung zu erwarten, dass der Bedarf noch weiter zunehmen wird. Die Kosten für die Behandlung chronischer Wunden bei Diabetes mellitus und arterieller Verschlusskrankheiten gehen in die Milliarden (Kremer and Berger, 1999). Aber auch für Weichteildefekte nach Unfällen und großflächigen Tumoroperationen werden neue Therapien für den Hautersatz benötigt.

Die derzeitigen Behandlungsmethoden sind häufig zeit- und kostenintensiv und zeigen oft verbesserungswürdige Wundheilungsergebnisse. Der ideale Wundverschluss sollte eine aseptische Barriere darstellen, die gleichzeitig den Flüssigkeitsverlust verhindert. Er darf weder toxisch noch antigen wirken. Auch mechanische Stabilität und die ästhetische Qualität der neuen Haut spielen eine große Rolle (Kremer and Berger, 2000).

Der „Goldstandard“ des permanenten Hautersatzes ist die autologe Hauttransplantation. Diese Methode ist aber bei großflächigen Wunden nicht mehr durch patienteneigene Haut zu realisieren. Das Verfahren autologer Spalthauttransplantation erzielt zudem meist nur ein unbefriedigendes Ausheilungsergebnis mit Wundkontraktion und Narbenbildung (Kremer and Berger, 1999).

In den letzten 30 Jahren sind eine Vielzahl von unterschiedlichen biologischen und synthetischen Hautersatzmaterialien, sowie Produkte mit humanen patienteneigenen Zellen auf den Markt gekommen, an deren Weiterentwicklung ständig gearbeitet wird. Eine Möglichkeit ist die Züchtung eines Hautersatzes *in vitro*, welcher sich nach der Transplantation in das Wundbett integrieren soll. Zur Herstellung eines zellulären Hautersatzes benötigt man entwicklungsfähige Zellen. Ein großes Problem besteht in den meisten Fällen in der Gewinnung der benötigten Zellmenge. Humane Stammzellen gelten dabei als vielversprechende Zellquelle für autologe Therapien. Seit 1975 können Keratinozyten isoliert und ausreichend vermehrt werden. Seit 1981 werden diese auch für die *in vitro* Generierung von permanentem, allogenen aber auch autologem Epidermisersatz verwendet (O'Connor, 1981; Phillips and Gilchrist, 1992; Rheinwald and Green, 1975). Ein Nachteil dieser Keratinozytenschichten ist das Schrumpfen um bis zu 50 % nach dem Ablösen aus der Zellkulturschale. Darüber hinaus ist die Handhabung aufgrund der Fragilität sehr schwierig. Zudem weisen sie eine unsichere Einheilungsrate auf, da das Transplantat keine dermale Komponente aufweist (Rue *et al.*, 1993). Wenn sich nach der Transplantation eine Neoepidermis gebildet hat, ist diese zudem sehr anfällig für mechanische Belastungen (Herzog *et al.*, 1988; Williamson *et al.*, 1995).

Eine andere Alternative stellt die Herstellung einer biokompatiblen und bioresorbierbaren Matrix dar, welche in der Lage ist die gewebständigen Zellen zu rekrutieren. Zu den Produkten für einen permanenten Hautersatz gehören Integra und Matriderm. Integra besteht aus Kollagen und enthält als weitere Bestandteile Proteoglykan und eine Silikonschicht, die nach der Transplantation die Wunde vor Infektionen und Austrocknung schützen soll. Matriderm besteht aus Kollagenfasern und Elastin. Nach der Transplantation werden die Substitute von gewebständigen Zellen besiedelt. In klinischen Studien haben sich zwar beide Produkte bewährt (Haslik *et al.*, 2007; Weigert *et al.*, 2011), allerdings sind die entstehenden Kosten

enorm. Hinzu kommt bei Integra eine zweite Behandlung mit einem Epidermisersatzverfahren, meist Spalthaut.

Hautersatzmaterialien sind wichtige Hilfsmittel bei der Behandlung von Vollhautdefekten, wo sie bevorzugt in Kombination aus Epidermis- und Dermisersatz mit einer zellulären Komponente verwendet werden. Diese Kombination soll zu einer schnelleren Reepithelialisierung und einer verminderten Wundkontraktion führen. Ein permanentes Kompositverfahren ist Apligraf. Der Dermisanteil besteht aus bovinem Kollagengel, das mit humanen neonatalen Fibroblasten besiedelt ist. Darauf befinden sich mehrere Lagen humaner Keratinozyten. Apligraf konnte bei Patienten mit venöser Insuffizienz bereits erfolgreich eingesetzt werden (Eaglstein and Falanga, 1997; Falanga and Sabolinski, 1999; Zaulyanov and Kirsner, 2007). Meist sind Kompositverfahren technisch sehr aufwendig und mit hohen Kosten verbunden (Kamolz *et al.*, 2008). Hinzu kommt die Problematik der unzureichenden Versorgung des Hautersatzes *in vivo* aufgrund der fehlenden Vaskularisierung des Transplantates (Bouchie, 2002).

Neben dem Einsatz von Keratinozyten und Fibroblasten, konnte eine verbesserte Wundheilung auch durch verschiedene Zelltypen der Haut (siehe Kapitel 1.2.4), aber auch durch Zelltypen anderer Gewebe, wie den pankreatischen Stammzellen oder den Knochenmarkstammzellen erzielt werden (Egana *et al.*, 2009a; Egana *et al.*, 2009b; Salem *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Der Einsatz einer neuen Stammzellpopulation aus humanen Schweißdrüsen ist aufgrund ihrer einfachen Erreichbarkeit in der Haut im Hinblick auf eine autologe Stammzelltherapie sehr vielversprechend.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung einer neuen Stammzellquelle aus humanen Schweißdrüsen für einen möglichen klinischen Einsatz in der Wundheilung. Da bisher keine spezifische Gen- oder Proteinexpression für adulte Stammzellen bekannt ist, müssen bei jeder Gewinnung einer neuen Stammzellpopulation die Zellen ausführlich charakterisiert werden. Die durchzuführenden Untersuchungen sollten zu einer Optimierung und Standardisierung der Zellisolation aus humanen Hautbiopsien und zu einer Anpassung der Kultivierungsbedingungen der neu gewonnenen Stammzellpopulation beitragen. Des Weiteren sollten die Proliferations- und Wachstumscharakteristika der neuen Stammzellpopulation analysiert und ihr Expressionsprofil auf Gen- und Proteinebene untersucht werden. Das spontane und induzierte Differenzierungspotential der neuen Stammzellpopulation sollte zur Ermittlung des Ursprungs und zur Abgrenzung zu anderen bereits etablierten Stammzelllinien, wie den epidermalen Stammzellen und den Knochenmarkstammzellen, geprüft werden. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung der neuen Stammzellpopulation sollte deren wundheilungsfördernde Zytokinsekretion bestimmt werden. Zur direkten Nutzung transplantierte, nativer, humaner Schweißdrüsen sollte außerdem deren Kultivierbarkeit in einem kollagenhaltigen Hautersatz überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Actrapid Penfill (Insulin)	Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dänemark)
Aminosäuren, nicht essentielle	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Antibiotic-Antimycotic 100x	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Alcianblau 8GX	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Aceton	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
β -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Carbogen	Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland)
Coomassie Brillant Blue-G250	Merk (Darmstadt, Deutschland)
4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Roche (Basel, Schweiz)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose + L-Glutamine	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Dispase II	Roche (Basel, Schweiz)
EpiLife	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol, 99%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Gelatine	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Indomethacin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Immunglobulin	CSL Behring (Hattersheim am Main, Deutschland)
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Isopropanol 99,9 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Insulin-Transferrin-Selenium ITS Premix	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kalziumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kollagenase NB 8	Serva (Heidelberg, Deutschland)
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
L-Prolin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Modified Eagle's Medium	Gibco, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	BioAssay Systems (Hayward, USA)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumpyruvat 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Nylonmembran	Sefar (Heiden, Schweiz)
Neutralrot	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Oil Red O	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
ortho-Phosphorsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories (Pasching, Österreich)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Qiaxcel Alignment Marker 15 bp/500 bp	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)
Saccharose D (+)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tissue Tek	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
<i>transforming growth factor-β3 human</i> (TGF-β3)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl) aminomethan hydrochlorid (Tris- HCL)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
TritonX 100	Fluka (Buchs, Schweiz)
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Ziegennormalserum	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

2- und 4-Well Chamber Slides	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Einweg-Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glaspipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Kanülen ø 0,9 mm	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Kollagen Typ IV-beschichtete Zellkulturschalen (60 und 100 mm)	BD Bioscience (Kalifornien, USA)
Kryoröhrchen (2 ml)	Techno Plastic Products (TPP) (Trasadingen, Schweiz)
Micro-Assay-Plate (black, clear bottom)	Greiner Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Mikropinzetten	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) und Codman & Shurtleff Inc. (Paramount, USA)
NucleoCassette	ChemoMetec (Allerød, Dänemark)
Optimaix	Matricel GmbH (Herzogenrath, Deutschland)
Objektträger (Super Frost Plus)	Menzel (Braunschweig, Deutschland)
PCR-Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
PCR-Platte (96-Well)	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen (10, 100 und 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (1,5, 2, 15 und 50 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Corning Incorporated (Corning, USA)
Skalpelle	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Spritzen (1, 50 ml)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm ²)	Techno Plastic Products (TPP) (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten Cellstar (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Techno Plastic Products (TPP) (Trasadingen, Schweiz)
Zellschaber (24 cm)	Techno Plastic Products (TPP) (Trasadingen, Schweiz)

2.1.3 Kits

Alkaline Phosphatase Kit	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Human Cytokin Array Kit	R&D (Minneapolis, USA)
Nuclear Extract Kit	Active Motif (La Hulpe, Belgien)
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Silverquant Detection Kit	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Transcription Factor Stem Cell Chip	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.4 Geräte

Analysewaagen

Kern AEJ	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
Kern 770	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
Brutschrank	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Chemilumineszenzdetektor Fusion-SL	Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)
Einfrierbox	Thermo Scientific (Waltham, USA)
FACSCalibur	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kryotom HM560	Microm (Walldorf, Deutschland)
Mastercycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroskope	
Axiovert 40C	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Axio Observer Z.1	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
NanoDrop 1000	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
NucleoCounter	Chemometec (Allerød, Dänemark)
Qiacube	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiaxcel	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QiaGility	Qiagen (Hilden, Deutschland)
qPCR Mastercycler ep Realplex ²	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Silverquant Scanner	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Schüttler GFL 3031	Hassa Laborgeräte (Lübeck, Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Vortexer MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, Deutschland)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Werkbank, Biowizard Silver Line	Koajair Tech Oy (Vilppula, Finnland)
Zentrifugen	
Centrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Allegra x 15R Centrifuge	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

2.1.5 Software

AxioVision 4.8	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
BioCalculator 3.0	Qiagen (Hilden, Deutschland)
CellQuest Pro 6.0	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software (La Jolla, USA)
ImageJ	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Power Point 2007	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Mikrowin 2000	Berthold Technologies (Wien, Österreich)
TF-Chip Data Analysis Tool 1.2	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
RealPlex 2.2	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.6 Lösungen

Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue-G250 4,75 % (v/v) 25 ml 95 % Methanol 8,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure
Dispase II	HEPES-Stammlösung 6 ml Dispase II 2 U/ ml 13,33 mg
Methanol-Aceton (7:3)	Methanol 42 ml Aceton 18 ml
Neutralrot	100 µg/ ml in PBS
PFA-Fixierlösung	4 % PFA 4 g Saccharose 10 g PBS 100 ml einige Tropfen NaOH pH 7,4

Stopplösung	10 % FKS in PBS
Trypsin 0,1 %	0,1 % Trypsin in PBS
TBST + 0,1 % BSA	150 mM Natriumchlorid 8,76 g 10 mM Tris 1,21 g 0,05 % TritonX 100 500 µl 0,1 % BSA 1 g destilliertes Wasser 1 l pH 8,0
MTT 5 mg/ ml	MTT 0,1 g PBS 20 ml
Einfriermedium	10 % DMSO 90 % FKS
qPCR	
Mastermix	1 µl Reverse Transkriptase 4 µl Reverse Transkriptase Puffer 1 µl Primermix
qPCR Mix	12,5 µl SYBR Green Master Mix 2,5 µl Primer-Mix 10 µl cDNA/ Wasser
Differenzierung	
1 % Alcianblaulösung	Alcianblau 500 mg 3 % ige Essigsäure 50 ml
100 mM Glycerol- phosphat	Glycerolphosphat 216 mg destilliertes Wasser 10 ml Lagerung bei -20 °C
1 mM Dexamethason	Dexamethason 3,9 mg 99 % Ethanol 10 ml Lagerung bei -80 °C
Fixierlösung für Alkalische Phosphatase Färbung	Citrat-Lösung 2,5 ml Aceton 6,5 ml 37 % Formaldehyd 0,8 ml
50 mM Indomethacin	Indomethacin 178,9 mg DMSO 10 ml Lagerung bei -80 °C
1 mg/ ml Insulin	Actrapid Penfill (Insulin) 1 ml destilliertes Wasser 2,5 ml Lagerung bei -20 °C
250 mM IBMX	IBMX 100 mg DMSO 1,8 ml Lagerung bei -20 °C
50 mg/ ml L-Ascorbin- säure-2-Phosphat	L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 500 mg destilliertes Wasser 10 ml Lagerung bei -20 °C

40 mg/ ml L-Prolin	L-Prolin 400 mg destilliertes Wasser 10 ml Lagerung bei -20 °C
100 mg/ ml Natrium- pyruvat	Natriumpyruvat 100 mg destilliertes Wasser 1 ml Lagerung bei -20 °C
0,3 % Oil Red O	Oil Red O 300 mg 99 % Isopropanol 100 ml
Transforming Growth Factor-β3	TGF-β3 1 µg destilliertes Wasser 1 ml Lagerung bei -20 °C
Durchflusszytometrie	
Puffer A	PBS 1 % FKS
Immunglobulin-Lösung	Immunglobulin 0,1 ml PBS 9,9 ml

2.1.7 Zelllinien und Langzeit-Zellkulturen

Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen <i>sweat gland-derived stem cells</i> (SGSCs)	Adulte Stammzellen humaner Schweißdrüsen, aus der Fraunhofer EMB, Passage 0–21, 5 Patienten; CEsg1, CEsg3b, CEsg14, CEsg16 und CEsg17 entsprechen SGSC#1- SGSC#5
Knochenmarkstammzellen <i>bone marrow stem cells</i> (BMSCs)	Präparation des Oberschenkelknochens von PromoCell, Passage 12-16
Epidermale Stammzellen <i>epidermal stem cells</i> (EpiSCs)	Adulte Stammzellen der Epidermis aus der Fraunhofer EMB, Passage 2-3
Dermale Fibroblasten	Präparation des Augenlids von PromoCell, Passage 10-12

2.1.8 Zellkulturmedien

Isolationsmedien

HEPES-Stammlösung (pH 7,6)	2,383 g HEPES auf 100 ml Aqua bidest.
HEPES-Eagle-Medium (pH 7,4)	90 ml Modified Eagle Medium 10 ml HEPES-Stammlösung

Isolationsmedium (pH 7,4)	32 ml HEPES-Eagle-Medium 5 % BSA in Aqua bidest. 8 ml 0,1 M Kalziumchlorid 300 µl
Digestionsmedium (pH 7,4)	20 ml Isolationsmedium 4 ml Kollagenase
Kultivierungsmedium DMEM 10 %	DMEM 10 % FKS 100 U/ ml Penicillin 0,1 mg/ ml Streptomycin
Kultivierungsmedium DMEM 20 %	DMEM 20 % FKS 100 U/ ml Penicillin 0,1 mg/ ml Streptomycin
<i>mesenchymal stem cell growth medium (MSC-GM)</i> PromoCell	MSC Basis Medium MSC Supplement 100 U/ ml Penicillin 0,1 mg/ ml Streptomycin
EpiLife Gibco	EpiLife Basis Medium EpiLife Defined Growth Supplement 0,6 % Antibiotic-Antimycotic 100x
Differenzierungsmedium für <i>organoid bodies</i> (OBs)	380 ml DMEM 100 ml FKS (30 min inaktiviert bei 54 °C) 5 ml L-Glutamin 3,5 µl β-Mercaptoethanol auf 5 ml PBS 5 ml nicht essentielle Aminosäuren 100 U/ ml Penicillin 0,1 mg/ ml Streptomycin
Mesodermale Differenzierungsmedien	
Adipogenes Differenzierungsmedium	DMEM 10 % 0,5 mM IBMX 1 µM Dexamethason 200 µM Indomethacin 10 µg/ ml Insulin
Adipogenes Erhaltungsmedium	DMEM 10% 10 µg/ ml Insulin
Chondrogenes Differenzierungsmedium	DMEM 100 nM Dexamethason 100 µg/ ml L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 10 ng/ ml Transforming Growth Factor-β3 1 mM Natriumpyruvat 40 µg/ ml L-Prolin 1x ITS Plus Premix
Osteogenes Differenzierungsmedium	DMEM 10% 100 nM Dexamethason 50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 10 mM Glycerolphosphat

2.1.9 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper. In der Tabelle angegeben sind die verwendeten Symbole, die vollständigen Namen, der Wirt, aus dem die spezifischen Antikörper stammen, die Verdünnung, die Zielstruktur und der Hersteller. mono-monoklonal, poly-polyklonal, K-Kaninchen, M-Maus, R-Ratte

Symbol	Name	Wirt	Verdünnung	Zielstruktur	Hersteller
AP	<i>alkaline phosphatase</i>	M mono	1:50	Zellmembran	R&D Sys.
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>	M mono	1:1000	filamentär	Dako
Amylase	Amylase G-10	M mono	1:500	zytoplasmatisch	Santa Cruz
β 3T	β 3Tubulin	M mono	1:300	filamentär	Santa Cruz
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>	K poly	1:500	Zellmembran	Abcam
K7	Keratin 7	K poly	1:500	filamentär	Abcam
K14	Keratin 14	M mono	1:250	filamentär	Santa Cruz
K15	Keratin 15	M mono	1:100	filamentär	Millipore
K19	Keratin 19	M mono	1:50	filamentär	Sigma
α 6	Integrin alpha 6	R mono	1:100	Zellmembran	Santa Cruz
Ki67	Ki67	K poly	1:500	nukleär	Abcam
Laminin	Laminin-5	M mono	1:200	Zellmembran	Santa Cruz
Mucin	Mucin1	M mono	1:500	Zellmembran	Santa Cruz
Nanog	Nanog	K poly	1:1000	nukleär	Millipore
Nestin	Nestin	K poly	1:500	filamentär	Abcam
Nestin	Nestin	K mono	1:100	filamentär	Millipore
NF*	Neurofilament H	K poly	1:500	filamentär	Serotec
NF*	Neurofilament L	K poly	1:200	filamentär	Fisher Scientific
NF*	Neurofilament H&M	M mono	1:200	filamentär	Millipore
NF*	Neurofilament L	M mono	1:50	filamentär	Millipore
NF*	Neurofilament M	K poly	1:100	filamentär	Santa Cruz
Nucleostemin	Nucleostemin	K poly	1:500	nukleär	Santa Cruz
Oct4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>	K poly	1:100	nukleär	Santa Cruz
p63	Tumorprotein 63	M mono	1:250	nukleär	Santa Cruz
SOX2	<i>sex determining region Y-box 2</i>	K poly	1:500	nukleär	Abcam
	Isotyp-Kontrolle IgG2a	R			BD
	Isotyp-Kontrolle	K poly			Santa Cruz
	Isotyp-Kontrolle	M poly			Santa Cruz

*Die NF Antikörper wurden jeweils im Mix aus L-light, M-medium und H-heavy für Maus und Kaninchen verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper. In der Tabelle angegeben sind die Namen der Antikörper, der Wirt, die Spezifität, die Verdünnung und der Hersteller. Cy-Cyanin, FITC-Fluorescein-Isothiocyanat, Immunglobulin G-IgG

Antikörper	Wirt	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Cy3 Anti-Ratte IgG	Ziege	Ratte	1:400	Jackson ImmunoResearch
Cy3 Anti-Maus IgG	Ziege	Maus	1:500	Jackson ImmunoResearch
Cy3 Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Kaninchen	1:500	Jackson ImmunoResearch
FITC Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Kaninchen	1:500	Jackson ImmunoResearch

Tabelle 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper. Alle verwendeten Oberflächenantikörper stammen von BD. Als Wirt wurde die Maus verwendet. PE-Phycoerythrin, PerCP-Peridinin Chlorophyll Protein, Cy-Cyanin, Immunglobulin G-IgG

Antikörper	IgG	Markierung	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	$\mu\text{l}/\text{Test}$
CD9	IgG1- κ	PE	0,00625	1,6
CD29	IgG1- κ	PE-Cy5	0,025	0,4
CD44	IgG2b- κ	PE	0,0125	0,8
CD105	IgG1- κ	PerCP-Cy5.5	0,2	0,005
Isotyp	IgG1- κ	PE	0,05	0,2
Isotyp	IgG1- κ	PE-Cy5	0,00625	1,6
Isotyp	IgG2b- κ	PE	0,05	0,2
Isotyp	IgG1- κ	PerCP-Cy5.5	0,2	0,05

2.1.10 Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer. Angegeben sind das verwendete Gensymbol und der Gename. Die Bezeichnung Intronspannend gibt Auskunft über die Spezifität des Primers nur an mRNA zu binden. Des Weiteren werden die Produktgröße und die Herstellerbezeichnung dargelegt. Alle Primer stammen von Qiagen. bp-Basenpaare

Gensymbol	Gename	Intronspannend	Größe (bp)	Herstellerbezeichnung
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>	ja	83	Hs_ACTA2_1_SG
β -Aktin	β -Actin	ja	146	Hs_ACTB_1_SG
β 3T	β 3Tubulin	ja	78	Hs_TUBB3_1_SG
Albumin	Albumin	ja	106	Hs_ALB_1_SG
AP	<i>alkaline phosphatase</i>	ja	110	Hs_ALP_1_SG
Amylase	Amylase	ja	96	Hs_AMY2A_2_SG
CEA	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>	ja	91	Hs_CEACAM1_1_SG
Col7 α	<i>collagen Typ VII alpha 1</i>	-	80	Hs_COL7A1_1_SG
I α 6	Integrin alpha 6	ja	142	Hs_ITGA6_1_SG
Involucrin	Involucrin	ja	120	Hs_IVL_1_SG
K7	Keratin 7	ja	103	Hs_KRT7_3_SG
K14	Keratin 14	ja	76	Hs_KRT14_1_SG
K15	Keratin 15	ja	141	Hs_KRT15_2_SG
K19	Keratin 19	ja	117	Hs_KRT19_1_SG
K77	Keratin 77	ja	134	Hs_KRT77_1_SG
Ki67	Ki67	ja	86	Hs_MKI67_1_SG
KLF4	<i>Krueppel-like factor</i>	ja	72	Hs_KLF4_1_SG
Laminin	Laminin alpha-3	ja	107	Hs_LAMA3_1_SG
Loricrin	Loricrin	ja	80	Hs_LOR_2_SG
Mucin	Mucin1	ja	63	Hs_MUC1_1_SG
Nanog	Nanog homeobox	ja	164	Hs_NANOG_2_SG
Nestin	Nestin	ja	75	Hs_NES_2_SG
NF H	Neurofilament H	-	97	Hs_NEFH_1_SG
NF L	Neurofilament L	ja	99	Hs_NEFL_1_SG
NF M	Neurofilament M	ja	74	Hs_NEFM_1_SG
Nidogen	Nidogen	ja	123	Hs_NID1_1_SG
Oct4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>	-	77	Hs_POU5F1_va.2_SG
p63	Tumorprotein 63	ja	130	Hs_TP63_1_SG
PGP 9.5	<i>protein gene product 9.5</i>	ja	110	Hs_UCHL1_1_SG
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	ja	113	Hs_PPARG_1_SG
RunX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>	ja	101	Hs_RUNX2_1_SG
SOX2	<i>sex determining region Y-box 2</i>	-	64	Hs_SOX2_1_SG
vWF	<i>von Willebrand factor</i>	ja	108	Hs_VWF_1_SG

2.2 Methoden

2.2.1 Schweißdrüsenisolation aus der humanen Haut

Die Zellisolation der Schweißdrüsenstammzellen richtete sich ursprünglich nach einem Protokoll, das für glanduläre Stammzellen aus dem Pankreas etabliert wurde (Kruse *et al.*, 2004a) und bereits patentiert ist. Anschließend konnte von Kruse und Kollegen gezeigt werden, dass nach einer Kombination aus mechanischer und enzymatischer Gewebeverdauung proliferierende Zellpopulationen aus humanen Hautbiopsien gewonnen werden konnten (Kruse *et al.*, 2006a). In Anlehnung an dieses Isolationsprotokoll entwickelte Anna Emilia Matthießen (geborene Petschnik) im Rahmen ihrer Doktorarbeit ein Verfahren zur Isolation von Schweißdrüsen aus humanen Hautbiopsien (Petschnik, 2011). Dieses Verfahren und die Gewinnung von Nestin-positiven Zellen wurde in Petschnik *et al.* 2010 veröffentlicht. Das dort verwendete Verfahren wird in Kapitel 2.2.1.1 zusammengefasst und beschreibt die Gewinnung, der in dieser Arbeit verwendeten SGSC#1 und #2. In Kapitel 2.2.1.2 wird anschließend die Optimierung dieses Verfahrens und die Gewinnung der, ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten, SGSC#3, #4 und #5 beschrieben.

2.2.1.1 Schweißdrüsenisolation nach dem bisherigen Verfahren

Die humane Hautbiopsie wurde aus dem Transportgefäß in eine geeignete Kulturschale zur weiteren Bearbeitung überführt und großzügig von Fettanteilen befreit. Die Schweißdrüsen wurden aus der Achsel eines 37jährigen, männlichen Patienten mit inverser Akne isoliert. Dazu wurden etwa 1x 2x 2 cm² große Gewebestücke in Kollagenase-haltiges Digestionsmedium überführt, mit Scheren mechanisch zerkleinert und anschließend mit Carbogen (5 % CO₂ in O₂) begast. Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Inkubation (20 und 15 min) bei 37 °C und konstantem Schütteln (150 Umdrehungen pro Minute (UpM)). Zwischen den Inkubationen wurde der Präparationsmix in Isolationsmedium gewaschen und weiter mechanisch zerkleinert. Nach dem enzymatischen Verdau wurde der Präparationsmix durch Auf- und Abpipettieren in Glaspipetten mit immer kleineren Öffnungen (25, 10, 5 und 2 ml Pipetten) weiter zerkleinert und durch eine Nylonmembran (250 µm Porengröße) filtriert. Der in der Nylonmembran verbliebene Anteil des Präparationsmixes wurde in eine Zellkulturschale mit DMEM 20 % überführt. Nach einer anschließenden Neutralrot-Färbung erfolgte die Isolation der

Schweißdrüsen unter dem Lichtmikroskop. Die Schweißdrüsen wurden mithilfe von Mikropinzetten weitestgehend vom umliegenden Hautbindegewebe befreit und in Kollagen Typ IV-beschichtete Zellkulturschalen überführt. Dort wurden die Schweißdrüsen mithilfe von Kanülen am Boden der Zellkulturschale immobilisiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM 20 %. Nach wenigen Wochen wuchsen die ersten Zellen aus den Schweißdrüsen aus (SGSC#1).

Die Schweißdrüsenisolation der SGSC#2 wurde ebenfalls von Anna Emilia Matthießen durchgeführt, unterschied sich aber in einigen Punkten von der Schweißdrüsenisolation der SGSC#1. Die humane Achselbiopsie wurde aus dem Transportgefäß in eine geeignete Kulturschale zur weiteren Bearbeitung überführt und von überschüssigen Fettanteilen befreit. Die Achselbiopsie stammte von einer 23jährigen, weiblichen Patientin mit Hyperhidrosis Axillaris. Die Schweißdrüsen waren so vergrößert, dass sie mit einer Pinzette einzeln aus der Achselhaut entfernt werden konnten. Diese Methode der Schweißdrüsenisolation konnte nur ganz spezifisch für das Krankheitsbild der Hyperhidrosis Axillaris angewendet werden. Die isolierten Schweißdrüsen wurden in ein Becherglas mit Kollagenase-haltigem Digestionsmedium überführt und mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Inkubation (20 und 15 min) bei 37 °C und konstantem Schütteln (150 UpM). Zwischen den Inkubationen wurde der Präparationsmix in Isolationsmedium gewaschen und weiter mechanisch zerkleinert. Anschließend erfolgte die mechanische Zerkleinerung erst mit der Schere und danach durch Auf- und Abpipettieren in Glaspipetten mit immer kleiner werdenden Öffnungen. Nach der Filtration des Präparationsmixes durch die Nylonmembran wurde das Eluat bei 850 UpM für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in DMEM 20 % resuspendiert und in Kollagen Typ IV-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Schon am nächsten Tag waren adhärente Zellen detektierbar.

2.2.1.2 Verfahrensoptimierung der Schweißdrüsenisolation

Im Folgenden werden die angestrebten Optimierungen der Schweißdrüsenisolation dargelegt. Zum einen sollten die Optimierungen zu einer Vereinfachung der Isolationsmethode beitragen, was die Minimierung der manuellen Arbeiten zum Ziel hatte. Besonders zeitintensive zu optimierende Schritte stellten der mehrstufige

Verdauungsprozess, die mechanische Zerkleinerung und die Befreiung der Schweißdrüsen von umliegendem Bindegewebe dar. Zum anderen sollte die Schweißdrüsenausbeute erhöht werden. Dazu erfolgte die Austestung verschiedener Hautareale wie Bauch-, Kopf-, Brust, Oberschenkel und Achselhaut. Die Erhöhung der Schweißdrüsenausbeute sollte außerdem zur Minimierung der erforderlichen Biopsiegröße beitragen. Zudem sollte eine erhöhte Schweißdrüsenausbeute die Zellmenge in den frühen Passagen entscheidend vergrößern. Zu diesem Zweck sollte die Immobilisierung der Schweißdrüsen am Kollagen Typ IV-beschichteten Zellkulturboden optimiert werden, da nur aus den am Boden haftenden Schweißdrüsen Zellen auswachsen. Die Dauer bis zum Auswachsen der Zellen aus den immobilisierten Schweißdrüsen sollte ebenfalls minimiert werden.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit humaner Hautproben erfolgte die Optimierung zunächst an Schweißdrüsen der Pfotenhaut von Ratten. Dabei zeigte sich, dass ein Herauslösen der Schweißdrüsen aus der Dermis beim Entfernen der Epidermis, wie von Okada und Kollegen beschrieben, nicht möglich war (Okada *et al.*, 1983). In allen untersuchten Proben, unter Anwendung unterschiedlicher Verdaumedien, Temperaturen und Inkubationszeiten (Tabelle 5), waren keine Schweißdrüsen in der Epidermis nachweisbar (siehe Kapitel 3.2, Abb. 16a). Daher sollten im Folgenden die Schweißdrüsen aus dem dermalen Anteil der Haut isoliert werden.

Tabelle 5: Schweißdrüsenisolation durch das Ablösen der Epidermis. Die Austestung verschiedener Verdaumedien, Inkubationszeiten und Temperaturen führte nicht zu einer erfolgreichen Schweißdrüsenisolation durch das Ablösen der Epidermis von Rattenpfotenhaut. üN- über Nacht

Probe	Dispase üN 4 °C	Dispase 4 h 37 °C	Kollagenase üN 4 °C	Kollagenase 4 h 37 °C
1	x			
2		x		
3	x		x	
4	x			x
5		x		x

Die Entfernung der Epidermis, zur Isolation der Schweißdrüsen aus der Dermis, erwies sich trotzdem als vorteilhaft. Zum einen ist die Epidermis sehr widerstandsfähig und zum anderen zeigt sie bei längerer Inkubation mit Neutralrot eine falsch positive Färbung. Die Entfernung der Epidermis vereinfachte somit die nachfolgende mechanische Zerkleinerung der Dermis und die Isolation der Neutralrot gefärbten Schweißdrüsen. Deshalb wurde in weiteren Optimierungsschritten ein Dispaseverdau über Nacht bei 4 °C zur Entfernung der Epidermis vorgenommen. Für einen optimalen Dispaseverdau wurde die Haut in Stückchen von maximal 0,5 x 0,5 cm² geschnitten. Im Weiteren wurde die optimale Kollagenase-Inkubationszeit zum Verdau der Dermis untersucht. Diese ist entscheidend für die Erhaltung von bindegewebsfreien, aber noch intakten Schweißdrüsen. Es wurden Inkubationszeiten von 1, 1,5, 2 und 3 h ausgetestet (Tabelle 6). Dabei zeigte sich, dass nach einem längeren Verdau mehr vereinzelte Schweißdrüsen vorlagen. Diese ließen sich besser auf der Kollagen Typ IV-beschichteten Oberfläche immobilisieren und wuchsen schneller aus. Bei den Inkubationszeiten von 2 h und 3 h waren nur geringfügige Unterschiede in der Qualität und Quantität der isolierten Schweißdrüsen feststellbar. Diese Inkubationszeiten konnten somit als optimal für die Schweißdrüsenisolation aus Rattenpfotenhaut identifiziert werden. Eine bindegewebsfreie aber noch intakte Schweißdrüse aus der Rattenpfote ist in Kapitel 3.2 Abbildung 16c dargestellt.

Tabelle 6: Optimierung der Kollagenase-Inkubationszeiten. Eine Inkubationszeit zwischen 2 h und 3 h konnte als optimal für die Schweißdrüsenisolation aus Rattenpfotenhaut identifiziert werden. üN-über Nacht

Dispase üN 4 °C Kollagenase 37 °C	1 h	1,5 h	2 h	3 h
1	x			
2		x		
3			x	
4				x

Der Transfer des Protokolls auf humane Haut zeigte, dass die ermittelten Parameter gut übertragbar waren. Die optimale Kollagenase-Inkubationszeit der humanen Hautproben lag bei 3 h.

Neben der Optimierung des Verdauprozesses wurden auch alle anderen Isolationsschritte auf ihre Optimierbarkeit untersucht. Es wurden folgende Parameter

im Hinblick auf die Erhöhung der Schweißdrüsenausbeute und die Minimierung der manuellen Arbeiten angepasst.

Aufgrund der Optimierungen des Verdauprozesses konnte auf die mehrfache mechanische Zerkleinerung des Präparationsmixes verzichtet werden. Zudem trug dies zu einer erhöhten Anzahl von vollständig intakten Schweißdrüsen bei. Weil nach der Verdauung schon vereinzelt, intakte und bindegewebsfreie Schweißdrüsen vorlagen, musste keine aufwendige mechanische Befreiung der Schweißdrüsen von Bindegewebe durchgeführt werden. Diese bindegewebsfreien Schweißdrüsen ließen sich zudem leichter am Kollagen Typ IV-beschichtetem Zellkulturboden befestigen.

Das bisherige Isolationsverfahren der Schweißdrüsen konnte in allen angestrebten Verfahrenspunkten optimiert und etabliert werden. Das vollständige, optimierte Isolationsprotokoll wird nachfolgend dargelegt: Die Hautbiopsie wurde als erstes von großen Fettanteilen befreit, wobei darauf geachtet wurde den dermisnahen Anteil zu belassen, da sich Schweißdrüsen zum großen Teil auch in subkutanem Fettgewebe befinden. Um Epidermis und Dermis voneinander zu trennen, wurde eine Behandlung der nativen Haut mit Dispase durchgeführt. Die Hautbiopsie wurde dazu mit einem Skalpell in Stücke von maximal $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$ geschnitten und in PBS gewaschen, bevor sie in die Dispaselösung überführt wurde. Nach einer Inkubation über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde mithilfe einer Pinzette die Epidermis von der Dermis getrennt. Die Dermis wurde in Digestionsmedium mit einer Schere mechanisch zerkleinert und mit Carbogen begast. Danach erfolgte eine Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 UpM für 3 h in Kollagenase-haltigem Digestionsmedium. Anschließend wurde der Verdau mit DMEM 20% abgelöscht. Der Präparationsmix wurde in eine Zellkulturschale überführt und die Schweißdrüsen mit Neutralrot gefärbt. Nach ca. 10 min waren die Schweißdrüsen rot gefärbt und konnten unter der Sterilbank mithilfe eines Lichtmikroskops und speziellen Mikropinzetten isoliert werden. Die Schweißdrüsen wurden in Kollagen Typ VI-beschichtete Zellkulturschalen überführt und dort mit Kanülen am Zellkulturboden immobilisiert. Die Kultivierung erfolgte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 in DMEM 20% . Das Medium wurde alle $2\text{-}3$ Tage erneuert. Nach wenigen Tagen konnten die ersten auswachsenden Zellen aus der Schweißdrüse detektiert werden (siehe Kapitel 3.2, Abb. 17e).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus Biopsien humaner Haut 13 verschiedener Patienten reproduzierbar proliferierende Stammzellpopulationen gewonnen werden.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Subkultivierung der Zellen

Die SGSCs wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ in DMEM 20 % bis zur Passage 3 kultiviert. Ab Passage 4 wurden die SGSCs in DMEM 10 % kultiviert. Analog dazu wurden die dermalen Fibroblasten kultiviert. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 0,1 % Trypsin bei 37 °C vom Zellkulturboden abgelöst. Nach 2 min erfolgte das Ablöschen des Trypsins mit Medium. Nach einem behutsamen Klopfen des Zellkulturgefäßes, wurden noch adhärenente Zellen mit einem Zellschaber vom Zellkulturboden gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 UpM für 5 min. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in DMEM resuspendiert und in der gewünschten Menge wieder in Zellkulturgefäße eingesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Das Medium wurde während der Kultivierung alle 2-3 Tage gewechselt.

Die Kultivierung der BMSCs wurde in MSC-GM (*mesenchymal stem cell-growth medium*) durchgeführt. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 0,1 % Trypsin bei 37 °C vom Zellkulturboden abgelöst. Das Ablöschen der Reaktion erfolgte nach 2 min mit der Stopplösung. Nach einem behutsamen Klopfen des Zellkulturgefäßes, wurden noch adhärenente Zellen mit einem Zellschaber vom Zellkulturboden gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 UpM für 5 min. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in MSC-GM resuspendiert und in der gewünschten Menge wieder in Zellkulturgefäße eingesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Das Medium wurde während der Kultivierung alle 2-3 Tage gewechselt.

Die EpiSCs wurden in EpiLife kultiviert. Beim Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 0,1 % Trypsin bei 37 °C vom Zellkulturboden abgelöst. Das Ablöschen der Reaktion erfolgte nach 3-4 min mit der Stopplösung. Nach einem behutsamen Klopfen des Zellkulturgefäßes, wurden noch adhärenente Zellen mit einem Zellschaber vom Zellkulturboden gelöst. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 UpM für 5 min. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in EpiLife resuspendiert und in der gewünschten Menge wieder in Zellkulturgefäße eingesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Das Medium wurde während der Kultivierung alle 2-3 Tage gewechselt.

2.2.2.2 Kryokonservierung

Zur Konservierung wurden die Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen nach dem Trypsinieren bei 1000 UpM für 5 min zentrifugiert, in Einfriermedium (500 µl-1000 µl) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Ein kontinuierlicher (-1 °C/ min) Einfrierprozess auf -80 °C erfolgte in einer speziellen Isopropanol-Einfrierbox. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in Stickstofftanks mit einer Temperatur von -176 °C überführt.

2.2.2.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Nach der Entnahme der Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank wurden die Zellen durch kurzes Schwenken im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und bei 1000 UpM für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Medium resuspendiert. Die Einsaat der Zellen erfolgte in ein, der eingefrorenen Zellmenge entsprechendes, Zellkulturgefäß. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Der NucleoCounter wurde zur Bestimmung der Zellzahl verwendet. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl des Lysepuffers A versetzt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Die Zelllyse wurde mit ebenfalls 50 µl des Stabilisierungspuffers B gestoppt. Anschließend wurde das Zelllysate in die NucleoCassette geladen. Das enthaltene Propidiumiodid interkalierte in die DNA und markierte die freiliegenden Zellkerne. Nach der Anregung des Propidiumiodids wurde dessen Emission detektiert. Aus der angegebenen Zellzahl pro Milliliter konnte, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die Gesamtzellzahl der Zellsuspension berechnet werden.

2.2.2.5 MTT-Test

Der wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) dringt in die Zellen ein und wird von aktiven Zellen in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan reduziert. Die entstandene Menge an Formazan ist ein Maß für die Aktivität der Zellen. Nach einmaligem Spülen der Zellen mit PBS wurden 1,5 ml des mit Medium verdünnten MTT (0,5 mg/ ml) pro Well in eine 6-Well Platte

überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 1 h im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit PBS gespült. Durch Zugabe von 300 µl DMSO wurden die Zellen lysiert und das Formazan gelöst. Diese Lösung wurde in Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung bei -20 °C im Dunkeln gelagert. Nach Beendigung des Experimentes wurde die Extinktion der Lösung im Spektrophotometer bei 540 nm quantifiziert. Alle MTT-Tests wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt. Als Kontrolle wurde reines DMSO verwendet.

2.2.2.6 Wachstumskurven

Zur Analyse der Wachstumseigenschaften wurde die Proliferation und die Aktivität der SGSCs über die Zeit gemessen. Die Dokumentation erfolgte innerhalb einer Passage und über die komplette Kultivierung in einer Langzeitanalyse.

Für die Analyse der SGSCs innerhalb einer Passage wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well einer 6-Well-Platte eingesät und über 14 Tage kultiviert. Zu sechs Zeitpunkten wurden in dreifacher Bestimmung die Zellzahl und die Aktivität bestimmt. Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 500 µl 0,1 % Trypsin bei 37 °C abgelöst. Nach 2 min wurde die Reaktion mit der gleichen Menge Medium abgelöscht. Noch adhärenente Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Zellkulturboden gelöst und mithilfe einer 1000 µl Pipette vereinzelt. Mit dem NucleoCounter wurde die Gesamtzellzahl gemessen (siehe Kapitel 2.2.2.4). Die Verdopplungszeit wurde mit dem Algorithmus der Website doubling-time.com berechnet. Für die Bestimmung der Aktivität wurde ein MTT-Test verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.5).

Zur Anfertigung einer Langzeitwachstumskurve wurden die SGSCs nach dem Erreichen der Konfluenz vom Zellkulturboden abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die SGSCs in einem Verhältnis von 1:3 in neue Zellkulturgefäße eingesät. Dieses Verfahren wurde im dreifachen Ansatz über 13 Passagen durchgeführt.

2.2.3 Molekularbiologische Expressionsanalyse

2.2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Plus Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und das Zellpellet in Reaktionsgefäßen bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert. Zur Isolation der RNA wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. In einem Lysepuffer wurden die Zellen durch 10 maliges Auf- und Abpipettieren durch eine Kanüle aufgeschlossen. Die anschließende RNA-Isolation wurde im Qiacube durchgeführt. Dabei wurde zunächst die *genomic deoxyribonucleic acid* (gDNA) durch Bindung an eine Eliminator-Säule entfernt. Danach wurde die eluierte RNA an eine Silikat-Gel-Säule gebunden und mithilfe von 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch mithilfe des NanoDrop 1000. 2 µl der isolierten RNA wurden dazu auf das Ende eines optischen Faserkabels pipettiert. Das andere Ende des optischen Kabels wurde in Kontakt mit der isolierten RNA gebracht, dabei entstand eine Flüssigkeitssäule. Über zwei optische Wege (1 mm und 0,2 mm) wurde die isolierte RNA bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Zusätzlich wurde die Absorption der isolierten RNA bei 280 nm bestimmt. Ergab der Quotient aus 260/280 nm einen Wert um 2, konnte eine Verunreinigung der isolierten RNA mit Proteinen ausgeschlossen werden. Eine weitere Messung der isolierten RNA wurde bei 230 nm durchgeführt. Ergab der Quotient aus 260/230 nm einen Wert zwischen 1,8 und 2,2, konnte man von reiner RNA ausgehen.

2.2.3.3 cDNA-Synthese

Für die Durchführung der *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) ist *complementary DNA* (cDNA) erforderlich. Dazu wurde die vorher isolierte RNA mithilfe des Quantitect Reverse Transcription Kits in cDNA umgeschrieben. Zur Sicherstellung, dass keine gDNA in der späteren qPCR Probe vorliegt, wurde die gDNA verdaut. Dafür wurden 2 µl gDNA-Verdaupuffer mit 500 ng RNA (100 ng bei den Zellklonen), verdünnt mit RNase-freiem Wasser, auf ein Volumen von 14 µl gebracht. Dieser Mix wurde bei 42 °C für 2 min im Mastercycler inkubiert.

Anschließend wurden zu jeder Probe 6 µl des Mastermixes hinzugegeben und gut vermischt. Die Inkubation bei 42 °C wurde für 30 min fortgesetzt, bevor die Reverse Transkriptase 3 min bei 95 °C inaktiviert wurde. Anschließend wurde die entstandene cDNA mit 180 µl RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt und bis zur Durchführung der qPCR bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4 Quantitative PCR

Die qPCR erfolgte in einer 96-Well-Platte. Für jedes zu untersuchende Gen wurde der qPCR-Mix mit cDNA im Doppelansatz pipettiert oder optional der Qiagility verwendet. Für jeden verwendeten Primer wurde zusätzlich eine Kontrolle im Doppelansatz angesetzt, in der statt cDNA Wasser verwendet wurde. Diese Kontrolle diente der Feststellung von Kontaminationen oder der Bildung von Primerdimeren. Im Mastercycler ep Realplex² erfolgte die Aktivierung der Hotstart-Polymerase bei 95 °C für 5 min. Danach wurden die Doppelstränge der cDNA 10 s aufgeschmolzen, die Primer lagerten sich 30 s bei 60 °C an die Einzelstränge und die Polymerase synthetisierte den komplementären Strang. Der Vorgang der Aufschmelzung und Synthese des komplementären Strangs wurde in 42 Amplifikationszyklen wiederholt. Um die Amplifikation der DNA verfolgen zu können wurde SYBRGreen verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA (dsDNA). Nach jedem Zyklus wurde der Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen. Dieses ist proportional zur vorhandenen DNA-Menge. Nach der Amplifikation erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei stieg die Temperatur kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C an. Die dsDNA der spezifischen Produkte denaturierte bei ihrer kennzeichnenden Schmelztemperatur, was über die augenblickliche Abnahme des Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden konnte. Auf diese Weise konnten Kontaminationen mit unspezifischen Produkten ausgeschlossen werden, die eine andere Schmelztemperatur gezeigt hätten. Die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe des CalQplex-Algorithmus, der den ct Wert mithilfe der 2. Ableitung der Amplifikationskurve bestimmt. Bei einer Abweichung der Doppelwerte über 0,3 wurden diese nicht verwendet. Der Mittelwert der berechneten c_t Werte wurde in Relation zum verwendeten Haushaltsgen (β -Aktin) gesetzt.

$$\Delta ct = ct(\text{Zielgen}) - ct(\beta - \text{Aktin})$$

Zur Berechnung des relativen Genexpressionslevel/ β -Aktin wurde $R = 2^{-\Delta ct}$ verwendet. Zur Analyse des relativen Genexpressionslevels erfolgte zunächst die Berechnung der Differenz der Δct -Werte zwischen behandelten (z.B. *in vitro* SGSCs) und unbehandelten (z.B. *in situ* Schweißdrüsen) Proben.

$$\Delta\Delta ct = \Delta ct (\text{behandelt}) - \Delta ct (\text{unbehandelt})$$

Anschließend wurde mit der Formel $R = 2^{-\Delta\Delta ct}$ das relative Genexpressionslevel bestimmt. Bei der Auswertung der relativen Genexpressionslevel wurde von einem spezifischen Anstieg bei einer Erhöhung von mindestens 2 und einem spezifischen Abfall von mindestens 0,5 ausgegangen.

2.2.3.5 Kapillargelelektrophorese

Die entstandenen Produkte der qPCR wurden im Qiaxcel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Während der Auftrennung durchliefen die Produkte die Gelkapillaren und passierten einen Detektor, welcher die Fluoreszenz-Emission des interkalierenden Ethidiumbromids in die DNA ermittelte. Durch den verwendeten Alignment-Marker konnten Laufunterschiede zwischen einzelnen Gelkapillaren ausgeglichen werden. Mithilfe des DNA Size Markers konnte die spezifische Fragmentgröße der Produkte bestimmt werden. Die verwendete Software des Qiaxcel ist der BioCalculator.

2.2.4 Proteinbiochemische Analysen

2.2.4.1 Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung

Zur Proteinexpressionsanalyse der untersuchten Zellpopulationen und Gewebe wurde eine indirekte immunzytochemische Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Bei der hier angewendeten Methode erfolgte der Nachweis mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der an den spezifischen Primärantikörper bindet (Tabelle 1, 2). Dies führt zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals in Bezug auf die vorhandene Antigenmenge, da mehrere Fluorochrom-beladene Sekundärantikörper an einen, das Antigen markierenden, Primärantikörper binden können.

Damit die Zellen und Gewebe ihre ursprüngliche Architektur beibehielten, wurden sie direkt vor der Färbung fixiert. Bei der Verwendung von Zellen wurden diese in 2- oder

4-Well-Chamber Slides, bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert, einmal mit PBS gespült und fixiert:

- für Strukturproteine; -20 °C gekühlte Methanol/Aceton-Lösung für 5 min
- für Oberflächenproteine; PFA-Fixierlösung für 10 min und nach dreimaligem Waschen mit PBS, zur Permeabilisierung, 0,01 % TritonX Lösung für 10 min bei Raumtemperatur

Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen in einer 20minütigen Inkubation mit 10 % Ziegennormalserum bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37 °C mit den in TBST + 0,1 % BSA verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Optional konnte die Inkubation auch bei 4 °C über Nacht durchgeführt werden. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den in PBS verdünnten Sekundärantikörpern, für 1 h bei 37 °C. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurde der Zellkern mit 1 µg/ml DAPI für 5 min gefärbt. Danach wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewässert. Nach der Entfernung des Plastikrahmens um die Chamber Slides erfolgte das Eindecken des Objektträgers mit dem Eindeckmedium Vectashield und einem Deckglas.

Bei der Verwendung von Geweben wurden vor der Immunfluoreszenzfärbung Gefrierschnitte generiert. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Proben in Tissue Tek eingebettet. Bis zur Fertigung des Gefrierschnittes wurden die Gewebeblöcke bei -80 °C gelagert. Von dem gefrorenen Präparat wurden im Kryotom Gefrierschnitte von 8-14 µm angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor der Färbung wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, was die Haftung am Objektträger verbesserte. Zur Minimierung der verwendeten Antikörperlösungen wurden die Präparate mit einem Wachsstift umrandet. Danach erfolgte die Färbung kongruent zu den Zellen.

Um die Spezifität der immunzytochemischen Fluoreszenzfärbung kontrollieren zu können, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Um eine eventuelle Bindung des Sekundärantikörpers zu untersuchen, wurden die Färbungen auch ohne den Primärantikörper durchgeführt. Zusätzliche Kontrollfärbungen wurden mit Immunglobulin G realisiert. Dieses wurde in der gleichen Konzentration wie der

Primärantikörper eingesetzt und detektierte Bindungen der unspezifischen Bestandteile des Primärantikörpers. Zum Vergleich wurden wenn möglich zusätzliche Färbungen an Positivgeweben angefertigt.

Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die Kontrollen mit dem Immunglobulin G dienten dabei zur Einstellung der Belichtungszeiten. Quantitative Aussagen wurden durch Auszählung von jeweils drei repräsentativen Aufnahmen in einer 10fachen Vergrößerung vorgenommen. Zur Illustration wurden die Aufnahmen teilweise mit dem Adobe Photoshop bearbeitet.

2.2.4.2 Transkriptionsfaktor- Stammzellchip

Der Transkriptionsfaktor-Stammzellchip (TF-Chip) diente der Charakterisierung der SGSCs im Microarray-Format zum Nachweis von bis zu 12 aktivierten TF (Tabelle 7). Diese TF sind spezifisch für die Stammzell-Proliferation und die Differenzierung. Die dsDNA, welche die jeweils spezifischen Bindungssequenzen für die TF enthält, sind im Triplette auf eine beschichtete Glasoberfläche gespottet.

Tabelle 7: Transkriptionsfaktoren des Transkriptionsfaktor-Stammzellchips und deren Funktion.

Transkriptionsfaktor	Funktion
RunX2 (<i>runt-related transcription factor 2</i>)	Osteogene Differenzierung
c/EBPβ (<i>CCAAT/enhancer binding protein β</i>)	Adipogene Differenzierung
GATA-4	Kardiomyogene und primitive endodermale Differenzierung
HNF-1α/β (<i>hepatocyte nuclear factor-1α/β</i>)	Endodermale Differenzierung
HNF-3α (<i>hepatocyte nuclear factor-3α</i>)	Endodermale Differenzierung
HNF-4α (<i>hepatocyte nuclear factor-4α</i>)	Endodermale Differenzierung
MEF2 (<i>myocyte enhancer factor-2</i>)	Myogene und mesodermale Differenzierung
MyoD	Myogene Differenzierung
Oct4 (<i>octamer binding transcription factor 4</i>)	Pluripotenz
p53 (<i>protein 53</i>)	Tumorsuppressor
PPARγ (<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>)	Adipogene Differenzierung
Stat3 (<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)	Proliferation

Die Kernproteinextrakte wurden mithilfe des Nuclear Extract Kits nach den Herstellerangaben aus den SGSCs gewonnen. Dafür wurden etwa $2 \cdot 10^6$ Zellen aus subkonfluenten Zellkulturflaschen pelletiert und mithilfe eines Detergenz lysiert. Nach

anschließender Zentrifugation konnte aus dem Überstand die zytoplasmatische Proteinfraction gewonnen werden. Die vollständige Lyse des Pellets erfolgte mit dem Complete Lysis Buffer. Nach einer Zentrifugation befand sich die Kernproteinfraction im Überstand. Beide Proteinfractionen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Proteinkonzentration wurde durch eine spektrophotometrische Messung nach Bradford bestimmt. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet mit Proteinen Komplexe aus. Die ungebundene Form des Farbstoffes hat sein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschoben. Zur Bestimmung der Konzentration wurden je $1\text{ }\mu\text{l}$ Kernproteinextrakt mit $99\text{ }\mu\text{l}$ Wasser und 1 ml Bradford-Reagenz jeweils in Doppelbestimmung angesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit $1\text{ }\mu\text{l}$ Complete Lysis Buffer, $99\text{ }\mu\text{l}$ Wasser und 1 ml Bradford-Reagenz. Die spektrophotometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration des Kernproteinextraktes wurde mithilfe einer Eichkurve ermittelt. Die Anwendung des TF-Chips wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den Nachweis aktivierter TF wurden je $30\text{ }\mu\text{g}$ des Kernproteinextraktes verwendet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der TF-Chip in einer Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurde der TF-Chip über Nacht mit der Probe beladen. Am Folgetag wurde der beladene TF-Chip mit den spezifischen Primärantikörpern und nach einem Waschschrift mit den Biotin-markierten Sekundärantikörpern inkubiert (Abb. 11).

Die Detektion der gebundenen TF wurde unter Verwendung des Silverquant Detection Kits durchgeführt. Der Biotin-markierte Sekundärantikörper wurde von einem goldmarkierten Anti-Biotin-Konjugat gebunden. Nach Zugabe des Substrates welches Silbernitrat enthält, wurde dieses, unter der Katalyse der Goldpartikel, reduziert und ausgefällt. Dieser Prozess ist proportional zur Menge des gebundenen goldmarkierten Anti-Biotin-Konjugates. Nach anschließendem Waschen und Trocknen des TF-Chips konnte mithilfe des Silverquant-Scanners die kolorimetrische Detektion erfolgen. Zur Auswertung wurde die Silverquant analysis software verwendet. Zur Veranschaulichung und zum Vergleich der Daten der SGSCs untereinander wurde das TF-Chip Data Analysis Tool genutzt. Die Expression aktivierter TF wurde in relativen Einheiten (*arbitrary units, AU*) dargestellt.

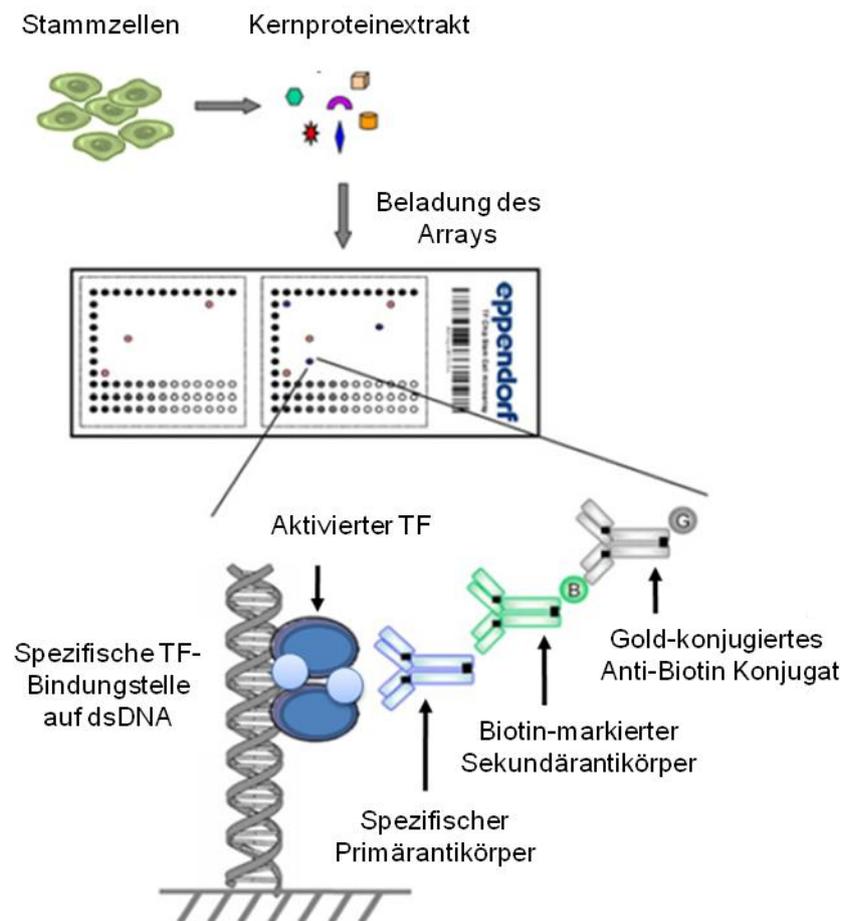


Abbildung 11: Transkriptionsfaktor-Stammzellchip. Nachdem das Kernproteinextrakt aus den Zellen gewonnen wurde, erfolgte die Beladung des Arrays. Wenn aktivierte Transkriptionsfaktoren (TF) aus der Probe an die doppelsträngige DNA (dsDNA) mit spezifischen Bindungsstellen gebunden haben, wurden diese von den spezifischen Primärantikörpern erkannt. Anschließend wurden die primären Antikörper von einem Biotin-markierten Sekundärantikörper gebunden. Das Biotin wird bei der Detektion der TF von einem Gold-markierten Anti-Biotin-Konjugat erkannt, welches als Katalysator zur Substratreduktion beiträgt. Veränderte Abbildung nach www.eppendorf.de

2.2.4.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie diente dem Nachweis von Oberflächenantigenen mittels Fluorochrom-markierten Antikörpern (Tabelle 3). Nachgewiesen wurde das *cluster of differentiation*, die so genannten CD-Moleküle. Die Fluoreszenz-markierten Zellen passierten in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander einen Laserstrahl. Dabei wurden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Zusätzlich streuten die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem Winkel von 3-10° gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße. Das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität und der Membranfaltung der Zellen.

Das von den verschiedenen Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangte dann auf photosensitive Detektoren, sogenannte Photomultiplier. Dort wurden die Lichtsignale in ein entsprechendes Spannungssignal umgewandelt. Im verwendeten Analysegerät, dem FACSCalibur, wurde der blaue Laser mit der Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Das optische Signal wurde zunächst in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt. FSC und SSC Signale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Tabelle 8 zeigt die Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome.

Tabelle 8: Absorptions- und Emissionswellenlängen. Verwendete Fluorochrome: PE-Phycoerythrin, PerCP-Peridinin Chlorophyll Protein, Cy-Cyanin

Detektionskanal	Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Anregungslaser	Emissionsmaximum
FL-2	PE	496/565 nm	488 nm	575 nm
FL-3	PE-Cy5	496/565 nm	488 nm	670 nm
FL-3	PerCP-Cy5.5	482 nm	488 nm	690 nm

Aufgrund der Eigenfluoreszenz der verwendeten Zellen im FL-1 Kanal wurden für den Nachweis nur Fluorochrome des FL-2 und FL-3 Kanals verwendet. Bei PerCP-Cy5.5 und PE-Cy5 handelt es sich um sogenannte Tandemkonjugate. Der erste Farbstoff wird dabei vom Laser angeregt und dient als Energiedonor für den zweiten Farbstoff (Cy5.5 oder Cy5). Diesen Energietransfer nennt man auch Energie Resonanz Transfer. Der zweite Farbstoff emittiert dann die Energie, die er vom ersten Farbstoff erhalten hat, als längerwelliges Licht.

Die anzufärbenden Zellen wurden aus der Zellkulturflasche geerntet, in Puffer A resuspendiert und auf Eis gestellt. Danach wurden jeweils $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (1000 UpM für 5 min bei 4 °C) wurden diese zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen mit einer Immunglobulin-Lösung für 2 min inkubiert. Der entsprechende Antikörper, (Tabelle 3) mit einer Konzentration von 0,01 µg/ 20 µl, wurde hinzupipettiert und 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Puffer A gewaschen und das Pellet in 200 µl Puffer A resuspendiert, in Messröhrchen überführt und weitere 300 µl Puffer A hinzupipettiert. Die Messung der Oberflächenexpression der gefärbten Zellen wurde am FACSCalibur durchgeführt.

Die Analyse erfolgte mit CellQuest Pro. Um optimale Ergebnisse zu erhalten wurden verschiedene Kontrollen verwendet. Die ungefärbten Zellen wurden dabei zur Einstellung der Spannung des SSC benutzt. Die Bezeichnung E-1 bei der Einstellung des FSC steht für die lineare Aufnahme des gestreuten Lichtes. Alle Einstellungen wurden so vorgenommen, dass sich die SGSCs als auch die BMSCs im Messbereich befanden. Die Empfindlichkeit der einzelnen Fluoreszenzdetektoren kann ebenfalls über die Spannung, die an den Photomultiplier angelegt wird, gesteuert werden. In Tabelle 9 sind alle Werte angegeben, die für die durchgeführten Experimente verwendet wurden.

Tabelle 9: Verwendete Spannungen. Einstellung der Spannung (mV) der Messkanäle für die SGSCs und BMSCs.

Kanal	SGSCs	BMSCs
FSC	E-1	E-1
SSC	311	288
FL-2	522	431
FL-3	445	431

Aufgrund der unterschiedlichen Zelleigenschaften der verwendeten Zellpopulationen in Bezug auf ihre Granularität und Oberflächeneigenschaften wurden unterschiedliche Spannungen für die Analysen verwendet. Da nur Einzelfärbungen durchgeführt wurden, konnte auf eine Kompensation zwischen den Fluoreszenzkanälen verzichtet werden. Die gewonnenen Daten wurden als zweidimensionale Punkt-Diagramme ausgewertet (Abb. 12).

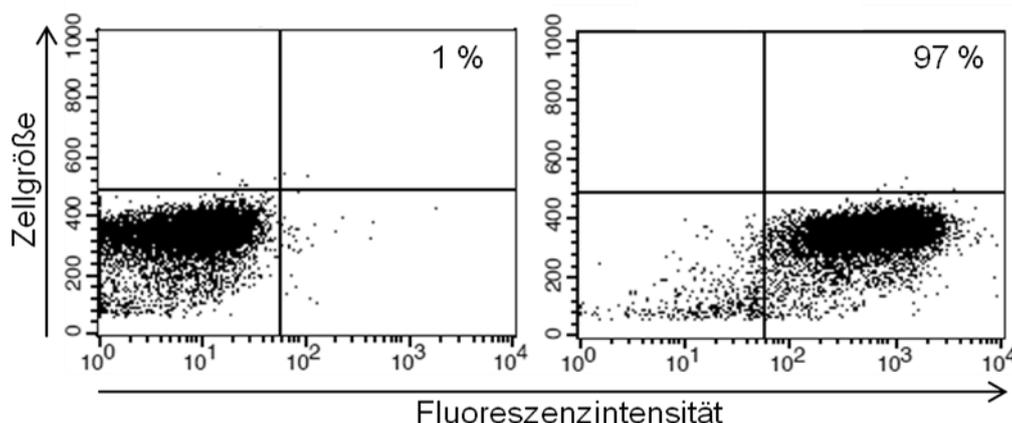


Abbildung 12: Auswertung im Punkt-Diagramm. Die Isotypkontrollen wurden zur Einstellung des Quadranten-Analysefensters verwendet. Das kongruente Analysefenster wurde zur Berechnung des prozentualen Anteils positiver Zellen in der gefärbten Probe angewandt.

Die Isotypkontrollen wurden zur Einstellung des Quadranten-Analysefensters, bei dem nur 1 % der Zellen als positiv erkannt wurde, verwendet. Diese Isotypkontrolle beinhaltet alle unspezifischen Anteile des verwendeten CD-Antikörpers. Das kongruente Analysefenster wurde für die Berechnung des prozentualen Anteils positiver Zellen in der gefärbten Probe angewandt. Zur einfacheren Illustration wurden die Ergebnisse der zweidimensionalen Punkt-Diagramme als eindimensionale Histogramme dargestellt (Abb. 13). Ein Histogramm zeigt eine Häufigkeitsverteilung, in der die Anzahl der Ergebnisse in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität aufgetragen wird. Für die Darstellung der prozentualen Antigenexpression wurde eine Überlagerung mit der entsprechenden Isotypkontrolle erstellt. Das Analysefenster M1 markierte dabei die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle, M2 markierte hingegen den Bereich der Fluoreszenzintensität der positiven Zellen der gefärbten Probe.

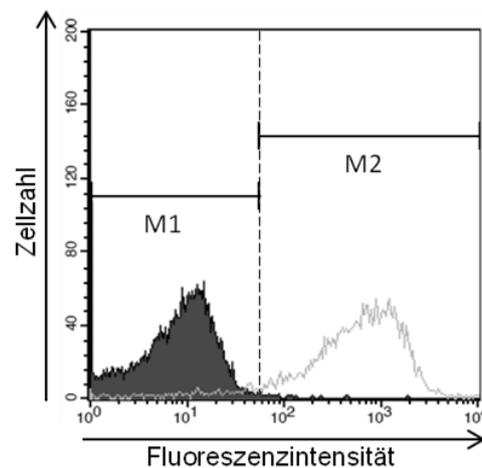


Abbildung 13: Auswertung im Histogramm. Zur Darstellung der prozentualen Proteinexpression wurde eine Überlagerung mit der entsprechenden Isotypkontrolle erstellt. Das Analysefenster M1 markierte dabei den Fluoreszenzbereich der Isotypkontrolle, M2 markierte hingegen den Fluoreszenzbereich der positiven Zellen der gefärbten Probe.

2.2.4.4 Zytokinsekretionsprofil

Zur Untersuchung der Sekretionseigenschaften der SGSCs wurde ein Zytokinarray verwendet. Mit diesem Array konnten Zytokine nachgewiesen werden, die von den SGSCs in das Zellkulturmedium abgegeben wurden. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Als Kontrolle wurde nur Medium verwendet. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt, die SGSCs mit PBS gespült und frisches Medium dazugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Medienüberstände abgenommen und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Das Zytokinarray besteht aus einer Nitrozellulosemembran, auf welche spezifische (capture) Antikörper als Duplikate gespottet sind (Abb. 14). Für die Analyse der sezernierten Zytokine wurde das Human Cytokine Array Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran in einer Blockierlösung inkubiert. Währenddessen wurde der Cocktail aus Biotin-markierten (detection) Antikörpern mit der Probe vermischt.

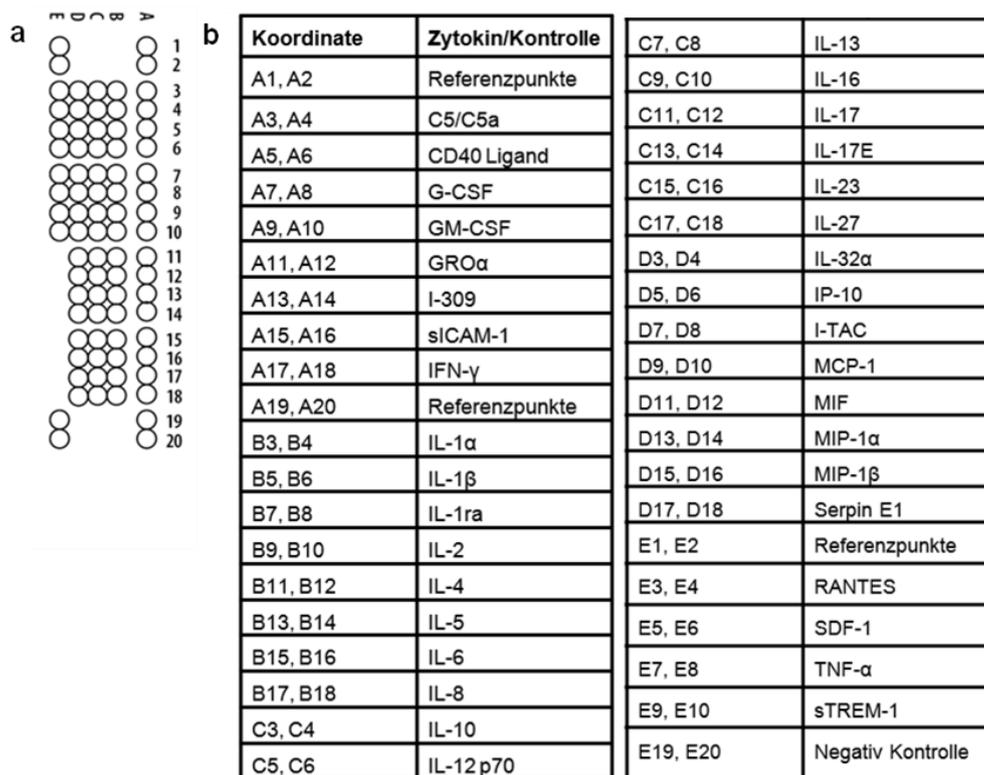


Abbildung 14: Zytokinarray a) Aufbau des Zytokinarrays und Nummerierung der Spots. b) Auflistung der gespotteten Antikörper. Veränderte Abbildung nach www.rndsystem.com

Die entstandenen Zytokin- Antikörper- Komplexe wurden bei der Inkubation mit der Membran an die gespotteten (capture) Antikörper gebunden. Diese sind spezifisch nur gegen die Zytokin-Antikörper-Komplexe gerichtete. Die Inkubation wurde über 3 h unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur und nicht, wie vom Hersteller empfohlen, über Nacht durchgeführt. Die gebundenen Biotin-markierten Antikörper konnten mittels eines Streptavidin-HRP (HRP-*horseradishperoxidase*) Systems nachgewiesen werden. Dabei oxidieren die freierwerdenden Protonen, aus der Reaktion von HRP mit dem oxidierenden Agens, das Substrat Luminol. Die entstehende Chemilumineszenz ist proportional zur Menge der gebundenen Zytokine und wurde mit dem Chemilumineszenzdetektor Fusion-SL Vilber Lourmat aufgenommen. Die Analyse des Arrays erfolgte mit ImageJ. Zur Auswertung wurden

die Bilder invertiert und der mittlere Grauwert von jedem Spot bestimmt. Dieser wurde vom maximalen Weißwert (255) abgezogen und in Relation zu den Referenzspots gesetzt.

$$\text{relative Zytokinexpression} = \frac{\text{Intensität (Mittelwert der Referenzspots)}}{\text{Intensität (Mittelwert der Zytokinspots)}}$$

2.2.5 Induzierte Differenzierung

2.2.5.1 Organotypische 3D Zellkultivierung

Die Methode der „Hängenden Tropfen“ stammt ursprünglich von den ESCs, welche in den *embryoid bodies* (EBs), Zelltypen aller 3 embryonalen Keimblätter bilden können (Guan *et al.*, 1999; Keller, 1995). Mithilfe dieser Methode bilden adulte Stammzellen ebenfalls Aggregate, sogenannte *organoid bodies* (OBs) (Kruse *et al.*, 2006b). Zur Generierung der OBs wurden zunächst bakteriologische Petrischalen mit jeweils 15 ml PBS gefüllt. Die SGSCs wurden im konfluenten Stadium geerntet und in Differenzierungsmedium resuspendiert. Mithilfe des NucleoCounters wurde die Zellzahl bestimmt. Die Verdünnung der SGSCs wurde so durchgeführt, dass $2 \cdot 10^3$ Zellen pro 20 μ l vorhanden waren. Mit einer Pipette wurden ca. 100 Tropfen a 20 μ l auf den Deckel der bakteriologischen Zellkulturschale pipettiert. Anschließend wurde der Deckel vorsichtig gedreht und auf die PBS gefüllte Zellkulturschale gegeben. Nach einer 2tägigen Inkubation hatten sich bereits sichtbare OBs in den hängenden Tropfen gebildet, welche mithilfe einer Pipette und DMEM 20 % vom Deckel der Zellkulturschale gespült wurden und weitere 4 Tage in einer bakteriologischen Zellkulturschale kultiviert wurden. Für die weitere Kultivierung der OBs wurden Gelatine-beschichtete Kulturgefäße verwendet. Dafür wurden Zellkulturschalen und Chamber Slides mit 1 % Gelatine beschichtet. Die flüssige Gelatine wurde für 1 h in den Kulturgefäßen inkubiert. Anschließend wurde diese abgesaugt und die Kulturgefäße unter sterilen Bedingungen 1 h getrocknet. Danach wurde Differenzierungsmedium in die Kulturgefäße vorgelegt und die OBs unter dem Mikroskop hinzupipettiert. Dabei wurden 4 OBs pro Kammer in ein 2-Well Chamber Slide überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte in Differenzierungsmedium welches alle 2-3 Tage ausgetauscht wurde. Zu einem subkonfluenten Stadium wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Die verbliebenen OBs wurden in einer Gelatine-beschichteten Zellkulturschale kultiviert und nach dem Erreichen der Konfluenz für die Analyse der Genexpression verwendet.

2.2.5.2 Mesodermale Differenzierung

Die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung wurde entsprechend der von Pittenger und Kollegen publizierten Methoden durchgeführt (Pittenger *et al.*, 1999). Die hier vorgestellten Untersuchungen sind Bestandteil einer anderen Arbeit, welche in Kooperation mit Franziska Rohr realisiert wurden (Rohr, 2012).

2.2.5.2.1 Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden $3 \cdot 10^3$ Zellen/ cm^2 in 4-Well-Chamber Slides ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel zu adipogenem Induktionsmedium. Alle 2-3 Tage wurde abwechselnd Induktions- und Erhaltungsmedium verwendet. In den Kontrollen wurde DMEM 10 % verwendet. Nach 7 und 21 Tagen erfolgte der Nachweis der adipogenen Differenzierung mittels Oil Red O. Dieser Azofarbstoff diente dem Nachweis von Triglyceriden und Lipiden. Vor der Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 30 min mit 10 % Formalin fixiert. Die Oil Red O-Stocklösung wurde im Verhältnis von 3:2 mit destilliertem Wasser verdünnt und filtriert. Das Formalin wurde entfernt und die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und für 5 min in 60 % Isopropanol inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der Oil Red O Lösung für 15 min inkubiert. Vor der Färbung mit Hämatoxylin wurden die Zellen einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zum Mikroskopieren wurde der Rahmen der Chamber Slides entfernt und die Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.5.2.2 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen in 500 μl DMEM 10 % in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 UpM für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet stehend über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am Folgetag wurde auf chondrogenes Differenzierungsmedium gewechselt. Nach 7 und 21 Tagen wurden die Zellpellets, die sogenannten *micromass bodies* (MMBs), zur Herstellung von 12 μm dicken Gefrierschnitten in Tissue Tek eingebettet. Diese wurden zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung mit Alcianblau gefärbt. Alcianblau geht mit sauren Gruppen der Mukopolysaccharide und Glykoproteine elektrostatische Bindungen ein und färbt diese aufgrund des enthaltenen Kuffers blau an. Die Gefrierschnitte wurden vor der Färbung auf Raumtemperatur gebracht und

für 10 min mit 70 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Schnitte einmal mit PBS gespült bevor sie in einer 1 %igen Alcianblaulösung über Nacht inkubiert wurden. Am Folgetag wurden die Gefrierschnitte, nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol, für die Mikroskopie mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.5.2.3 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden $3 \cdot 10^3$ Zellen/ cm^2 in 4-Well-Chamber Slides ausgesät und 2 Tage im Brutschrank mit DMEM 10 % kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel auf osteogenes Differenzierungsmedium. Nach 7 und 21 erfolgte der Nachweis der osteogenen Differenzierung über eine Färbung von Alkalischer Phosphatase (AP) mit dem Alkaline Phosphatase Kit. Die vorhandene AP spaltet dabei das Phosphat vom Substrat (Naphthol-AS-BI-phosphate). Das freigesetzte Naphthol bindet an farblose Diazoniumsalze und es entsteht ein roter Azofarbstoff. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, 30 s in der Fixierlösung inkubiert, 45 s mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich im Dunkeln für 15 min mit einer Naphthol AS-BI Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor eine Färbung mit Hämatoxylin erfolgte. Zum Mikroskopieren wurde der Rahmen der Chamber Slides entfernt und die Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen wurde das Statistikprogramm *GraphPad Prism* 5.0 verwendet. Bei der graphischen Darstellung der Versuchsdaten wurde der Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) verwendet. Für die statistische Analyse des relativen Genexpressionslevels verschiedener Patienten über mehrere Passagen wurde ein Two-way ANOVA (*analysis of variance*) durchgeführt. Es wurden nur Ergebnisse mit einer Signifikanz von unter 0,05 berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1 Lokalisation Nestin-positiver Stammzellen im Mesenchym humaner Schweißdrüsen

Zur Lokalisation der Nestin-positiven Zellen in der Achselhaut wurden umfassende histologische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen verschiedener Haut- und Schweißdrüsen-assoziiierter Proteine angewendet. Zur Identifizierung aller Hautanhangsgebilde in der Achselhaut wurde Laminin verwendet (Abb. 15a). Dieses Protein der Basalmembran verdeutlicht den Aufbau und die Organisation aller, ursprünglich aus der Epidermis stammenden, Hautanhangsgebilde. Laminin diente somit zur Abgrenzung der Epidermis von der Dermis. Für die Lokalisation der Schweißdrüsen in der humanen Achsel wurde ein Antikörper gegen Keratin 19 (K19) verwendet. K19 wird in humaner, adulter Haut von den luminalen Schweißdrüsenzellen exprimiert (Abb.15b). Zunächst konnten die ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen anhand ihrer Größe unterschieden werden. Das Lumen der apokrinen Schweißdrüsen (gestrichelte Linie) war im Durchmesser etwa 10-mal größer als das der ekkrinen Schweißdrüsen (durchgehende Linie). Die ekkrinen Schweißdrüsen befanden sich vorwiegend in der Dermis, während die apokrinen Schweißdrüsen tiefer in der Dermis und der Subkutis zu finden waren. Ekkrine und apokrine Schweißdrüsen lagen in unmittelbarer Nähe zueinander und wanden sich auch umeinander (unterbrochene Linie). Zur Unterscheidung von ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen wurden Antikörper gegen die Proteine *carcinoembryonic antigen* (CEA) und Mucin eingesetzt (Abb. 15c-f). CEA wird in den sezernierenden und ausführenden Kompartimenten der ekkriner Schweißdrüsen exprimiert (Abb. 15c-d). Mucin wird hingegen nur von den sezernierenden Kompartimenten der apokrinen Schweißdrüsen exprimiert (Abb. 15e-f). Diese immunzytochemische Analyse ergab eine eindeutige *in situ* Diskriminierung von ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen. Aufgrund der Morphologie, des Färbemusters von CEA und der fehlenden Expression von Mucin war es zusätzlich möglich zwischen dem Gang und dem sezernierenden Anteil der ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen zu unterscheiden. Eine Unterscheidung zwischen ekkrinem und apokrinem Gang war, aufgrund der kongruenten Morphologie und Proteinexpression, hingegen nicht möglich.

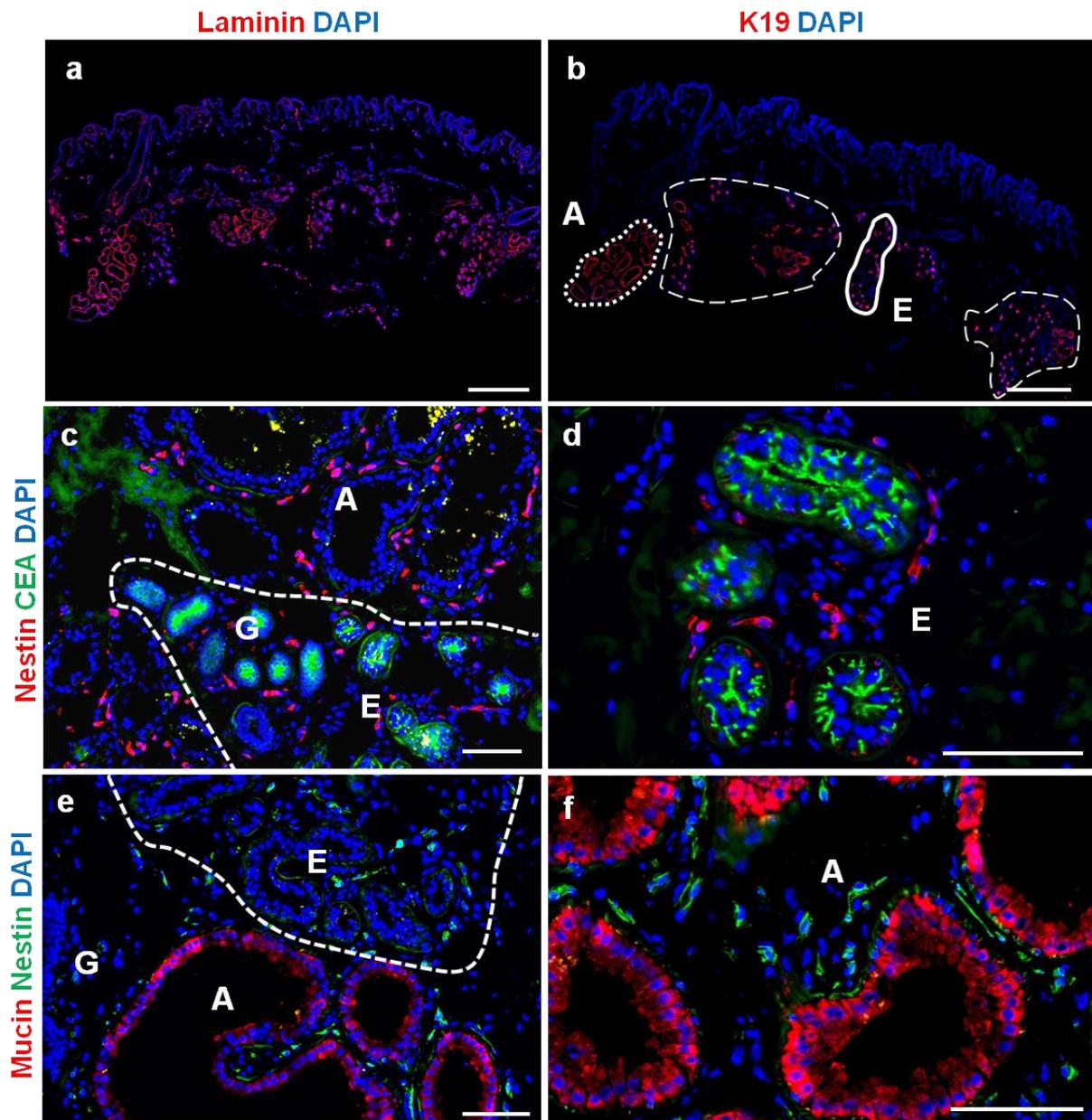


Abbildung 15: Immunzytochemische Fluoreszenzanalyse humaner Achselhaut. a) Zur Identifizierung der Anhangsgebilde der Achselhaut wurde Laminin verwendet. Als Bestandteil der Basalmembran grenzt es die Epidermis von der Dermis ab und umschließt alle Anhangsgebilde. b) Zur Lokalisation der Schweißdrüsen in der humanen Achsel wurde K19 verwendet. Es wird in humaner, adulter Haut von den luminalen Schweißdrüsenzellen exprimiert. Der Schweißdrüsentyp konnte anhand der Größe des Lumens bestimmt werden. Das Lumen von apokrinen (A, gestrichelte Linie) Schweißdrüsen ist größer als das der ekkrinen (E, durchgezogene Linie) Schweißdrüsen. Ekkrine und apokrine Schweißdrüsen lagen in unmittelbarer Nähe zueinander und wanden sich auch umeinander (unterbrochene Linie). c-d) Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung von CEA (grün) und Nestin (rot). CEA wird in den sezernierenden (E) und ausführenden Kompartimenten (Gang, G) von ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert. e-f) Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung von Mucin (rot) und Nestin (grün). Mucin wird in den sezernierenden Kompartimenten apokriner Schweißdrüsen (A) exprimiert. Die Lokalisation der Nestin-positiven Zellen konnte im Mesenchym der apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen sowohl in den sezernierenden als auch den ausführenden Kompartimenten nachgewiesen werden. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 μ m

Eine Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen Nestin erlaubte die Zuordnung der Nestin-exprimierenden Zellen zu den Schweißdrüsentypen und Kompartimenten. Diese Untersuchung demonstrierte, dass die Nestin-positiven Stammzellen im Mesenchym von ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen, sowohl in den sezernierenden als auch den ausführenden Kompartimenten lokalisiert waren (Abb. 15c-f). Als Stammzellnische der Nestin-positiven Zellen in den Schweißdrüsen konnte somit das Schweißdrüsenmesenchym identifiziert werden.

3.2 Isolation der Schweißdrüsen und Gewinnung einer Nestin-positiven Stammzellpopulation

Das bisherige Isolationsprotokoll der Schweißdrüsen aus humanen Hautbiopsien (siehe Kapitel 2.2.1.1) konnte nach Austestung verschiedener Verdauemedien, Inkubationszeiten und Temperaturen weiter etabliert und optimiert werden (siehe Kapitel 2.2.1.2). Aufgrund von seltenen humanen Hautproben erfolgte die Optimierung zunächst an Schweißdrüsen der Pfotenhaut von Ratten. Dabei zeigte sich, dass ein Herauslösen der Schweißdrüsen aus der Dermis beim Entfernen der Epidermis nicht möglich war (siehe auch Kapitel 2.2.1.2). Nach einer Anfärbung der Schweißdrüsen mit Neutralrot konnten diese nach der Entfernung der Epidermis immer noch in der Dermis, aber nicht in der Epidermis lokalisiert werden (Abb. 16a, b, siehe Pfeil).

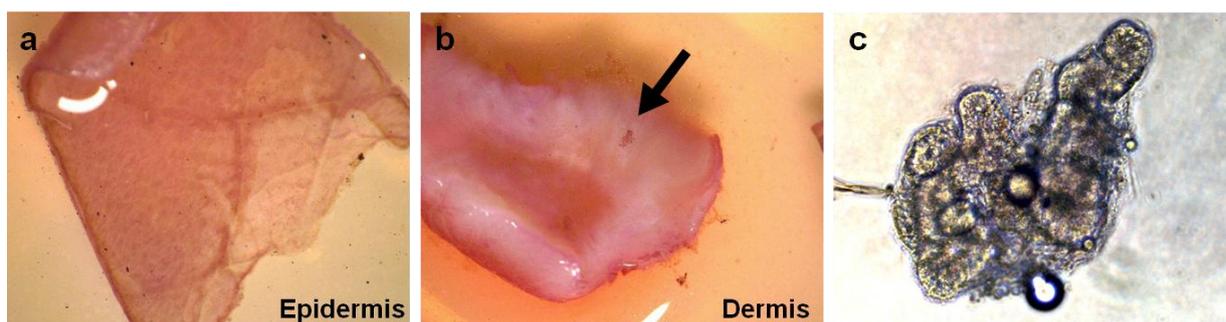


Abbildung 16: Isolationsoptimierung von Schweißdrüsen aus Rattenpfotenhaut. a) Nach einem Dispaseverdauer und der Trennung von Epidermis und Dermis konnten die Neutralrot-gefärbten Schweißdrüsen nicht in der Epidermis detektiert werden. b) Die Neutralrot-gefärbten Schweißdrüsen befanden sich immer noch in der Dermis (siehe Pfeil). c) Nach der Optimierung der Schweißdrüsenisolation aus der Dermis konnten bindegewebsfreie, aber völlig intakte Schweißdrüsen aus der Rattenpfotenhaut isoliert werden.

Deshalb wurden die weiterführenden Optimierungen des Isolationsprotokolls der Schweißdrüsen mit der Dermis fortgesetzt. Abbildung 16c zeigt die Erfolge der Optimierung der Isolationsmethode. Nach einem Verdau von 2-3 h in Kollagenasehaltigem Digestionsmedium konnten bindegewebsfreie, aber noch vollständig intakte Schweißdrüsen aus der Dermis der Rattenpfote isoliert werden. Der Transfer des optimierten Isolationsprotokolls auf humane Haut zeigte, dass die ermittelten Parameter gut übertragbar waren. Die optimale Inkubationszeit der Kollagenase von humaner Haut betrug 3 h.

Wie schon bei der Schweißdrüsenisolation aus der Rattenpfotenhaut, führte die optimierte Isolation auch bei den humanen Schweißdrüsen zu einer verbesserten Reinheit (intakte Schweißdrüsen, frei von umliegendem Bindegewebe) (Abb. 17a-c). In Abbildung 17a ist eine Neutralrot gefärbte apokrine (A) und ekkrine (E) Schweißdrüse nach der Isolation dargestellt. Auch nach der Isolation war eine Diskriminierung der apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen anhand ihrer Größe möglich. Zur Überprüfung des isolierten Gewebes auf Kontamination mit Schweißdrüsen-fremden Gewebeanteilen wurde dieses mit einem Antikörper gegen K19 gefärbt. In Abbildung 17b ist zu erkennen, dass nur K19 positive Schweißdrüsen isoliert wurden. Zur Lokalisation der Nestin-positiven Zellen wurden die isolierten Schweißdrüsen mit einem Antikörper gegen Nestin gefärbt. Nestin-positive Zellen befanden sich nach der Isolation immer noch im Mesenchym der Schweißdrüsen (Abb. 17c). Nestin-positive Zellen lagen in der Peripherie der isolierten Schweißdrüsen und könnten infolgedessen unmittelbar nach der Immobilisierung am Kollagen Typ IV-beschichteten Kulturschalenboden adhären. Nur wenige Tage nach der Isolation begannen adhärente Zellen aus der Schweißdrüse zu migrieren und zu proliferieren. Dabei exprimierten sie weiterhin Nestin (Abb. 17d).

Um das Verhalten der auswachsenden Nestin-positiven Zellen aus den isolierten Schweißdrüsen verfolgen zu können, wurde eine Zeitraffermikroskopie durchgeführt (Abb. 17e-h). Dazu wurden Schweißdrüsen aus der Achselhaut isoliert und mithilfe von Kanülen am Kollagen Typ IV-beschichteten Kulturschalenboden immobilisiert. Nach einer Inkubation von 2 Tagen im Brutschrank konnten die ersten auswachsenden Zellen beobachtet werden (Abb. 17e). Ab diesem Zeitpunkt wurden alle 30 min Aufnahmen, bis zum Erreichen der Konfluenz an Tag 10 nach der Isolation, erstellt. Die Zellen migrierten aus der Schweißdrüse und begannen sich zu teilen.

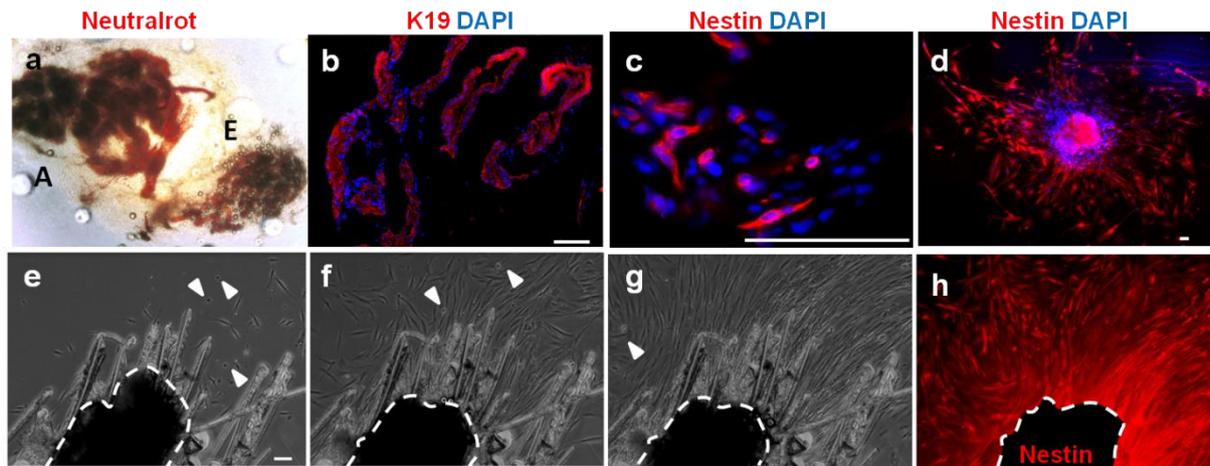


Abbildung 17: Schweißdrüsenisolation aus humaner Achselhaut und Gewinnung einer Nestin-positiven Zellpopulation. a) Isolierte und Neutralrot-gefärbte apokrine (A) und ekkrine (E) Schweißdrüse. b) Das isolierte Gewebe war ausnahmslos K19 positiv, was eine Kontamination mit Schweißdrüsen-fremdem Gewebe ausschließt. c) Nestin-positive Zellen befanden sich weiterhin im Mesenchym der isolierten Schweißdrüsen. d) Nach wenigen Tagen wuchsen Zellen aus den isolierten Schweißdrüsen aus. Diese exprimierten weiterhin Nestin. e-h) Analyse der auswachsenden Zellen aus der isolierten Schweißdrüse mittels Zeitraffermikroskopie. e) Mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast zeigten die ersten auswachsenden Zellen an Tag 2. f-g) Danach zeigte sich eine kontinuierliche Vermehrung der adhärennten Zellen über Tag 5 bis zur Konfluenz an Tag 10 (weiße Pfeilspitzen=mitotische Zellen). h) Fast jede ausgewachsene Zelle konnte an Tag 10 als Nestin-positiv detektiert werden. Die gestrichelte Linie umrandet das solide Gewebe der Schweißdrüse, welche mit der Kultivierungszeit immer kleiner wurde. Die Linien um die Schweißdrüse sind Kratzer der Kanüle in der Kollagen Typ IV-Beschichtung der Kulturschale, welche aus der Immobilisierung der Schweißdrüsen resultieren. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 µm.

Dies ist an den abgerundeten, mitotischen Zellen zu erkennen (siehe weiße Pfeilspitzen). Die resultierende Zellpopulation entstand gleichermaßen durch Migration der Zellen aus der Schweißdrüse als auch durch Zellteilungen. Ab Tag 5 migrieren sehr viele Zellen aus der Schweißdrüse, wobei sie die Kratzer in der Beschichtung häufig als Leitlinie nutzten (Abb. 17f). Für eine Migration der Zellen spricht zudem die Beobachtung, dass die Schweißdrüse über die Zeit immer kleiner wurde (Abb. 17e-g, gestrichelte Linie). An Tag 10 hatte sich ein konfluenter Zellrasen gebildet (Abb. 17g). Zu diesem Zeitpunkt wurde eine immunzytochemische Färbung der Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 17h zu erkennen, konnte fast jede Zelle als Nestin-positiv detektiert werden. Das solide Gewebe der Schweißdrüse wurde schwarz markiert, da dieses eine starke Eigenfluoreszenz aufwies. Mit dieser Zeitraffermikroskopie war die Verfolgung der auswachsenden Zellen von *in situ* zu *in vitro* möglich. Anhand dieser Aufnahmen konnte belegt werden, dass Nestin-positive Zellen am Zellkulturboden adhären und sich kontinuierlich teilen. Der Anteil an Nestin-exprimierenden Zellen in der resultierenden Zellpopulation lag bei etwa 90 %.

Die entscheidende Optimierung der Isolationsmethode lag im Zeitpunkt des Auswachsens der Nestin-positiven Zellen aus der Schweißdrüse. Diese migrierten schon nach 2 Tagen aus der Schweißdrüse im Gegensatz zum bisherigen Protokoll, bei dem die ersten Zellen erst nach einigen Wochen detektierbar waren. So gelang es in den frühen Passagen eine größere Zellmenge zu generieren.

Die Isolation der Schweißdrüsen war aus verschiedenen humanen Hautarealen möglich (Kopf, Bauch, Achselhaut, Oberschenkel). Dabei zeigten die Schweißdrüsen und die auswachsenden Nestin-positiven Zellen aus der Achselhaut die vielversprechendsten Eigenschaften. Neben der großen Schweißdrüsenausbeute aus der Achselhaut, konnte aus diesen Schweißdrüsen auch eine hohe Anzahl Nestin-positiver Zellen gewonnen werden, welche eine homogene Zellmorphologie und gute Proliferationseigenschaften zeigten. Deshalb wurden für die Analysen in dieser Arbeit ausschließlich Schweißdrüsen aus der Achselhaut verwendet.

3.3 *In vitro* Charakterisierung der SGSCs

Da bisher keine spezifische Gen- oder Proteinexpression für adulte Stammzellen bekannt ist, muss bei jeder Isolierung einer neuen adulten Stammzellpopulation aus anderen Geweben eine ausführliche Charakterisierung durchgeführt werden.

Eine umfassende *in vitro* Charakterisierung der Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen (*sweat gland derived stem cells*- SGSCs) wurde erstellt, um die Proliferations- und Wachstumseigenschaften als auch das spontane Differenzierungspotential zu analysieren. Hierfür wurden Untersuchungen des Expressionsprofils auf Gen- und Proteinebene der SGSCs durchgeführt. Die molekularbiologische Analyse zur Erfassung der Expression verschiedener mRNAs wurde mittels qPCR durchgeführt. Die Proteindetektion erfolgte mittels immunzytochemischer Fluoreszenzfärbungen und dem Transkriptionsfaktor-Stammzellchip (TF-Chip). Zusätzlich wurden zur Einschätzung der Plastizität der SGSCs Zellklone generiert.

3.3.1 Wachstumseigenschaften

Zur Analyse der Wachstumseigenschaften wurde die Proliferation und die Aktivität der Zellen über die Zeit gemessen. Die Dokumentation erfolgte innerhalb einer Passage und über die komplette Kultivierung hinweg in einer Langzeitanalyse.

Die Proliferationseigenschaften der SGSCs *in vitro* wurden über 14 Tage durch die Messung der Zellzahl und der Aktivität (MTT- Test) zu sechs Zeitpunkten analysiert (Abb. 18a). Die SGSC#1 zeigten eine Zunahme der Zellzahl und einen Anstieg der Aktivität über die Zeit. Auffällig im Wachstumsverhalten war die Stagnation der Zellzahl zwischen Tag 9 und 11 und die erneut einsetzende Proliferation bis zum Tag 14. Wenn die SGSCs in Zellkontakt kamen sank ihre Proliferation. Die Zellen veränderten sich morphologisch, sie wurden kleiner und länglicher und begannen erneut sich zu teilen. Dabei wuchsen sie aber nicht übereinander. Die berechnete Populationsverdopplung während der exponentiellen Phase zwischen Tag 2 und Tag 9 betrug 2,9 Tage. Dieses spezielle Wachstumsverhalten konnte bei den SGSC#1 in besonderem Maße beobachtet werden. Die SGSC#3 und #5, welche nach der optimierten Isolationsmethode gewonnen wurden, zeigten im Vergleich zu den SGSC#1 eine geringere Stagnation der Proliferation nach dem Erreichen der Konfluenz (Abb. 18b). Nach dem erneuten Anstieg der Proliferation erreichten sie die Plateauphase. Die Populationsverdopplung während der exponentiellen Wachstumsphase zwischen Tag 2 und Tag 9 lag ebenfalls bei 2,9 Tagen. Die Zellzahl der SGSC#3 und #5 lag deutlich unter der der SGSC#1, ihre Aktivität lag hingegen höher.

In einer Langzeitanalyse wurde die Proliferation der SGSCs über viele Passagen verfolgt (Abb. 18c). So zeigte sich ein hohes Proliferationsvermögen der SGSCs durch eine kontinuierliche Zellvermehrung bis Passage 13. Auch über diese Passage hinaus zeigte sich keine Proliferationsverlangsamung oder replikative Seneszenz. In Abbildung 18c sind die SGSC#1, welche nach dem bisherigen Isolationsprotokoll isoliert wurden, gegen die SGSC#5, welche nach dem optimierten Isolationsprotokoll isoliert wurden, aufgetragen. Wie bereits beschrieben, konnte durch die Optimierung des Isolationsprotokolls die initiale Zellmenge vergrößert werden. Nach der Isolation zeigten beide Zellpopulationen ähnliche Proliferationseigenschaften während der Langzeitkultivierung.

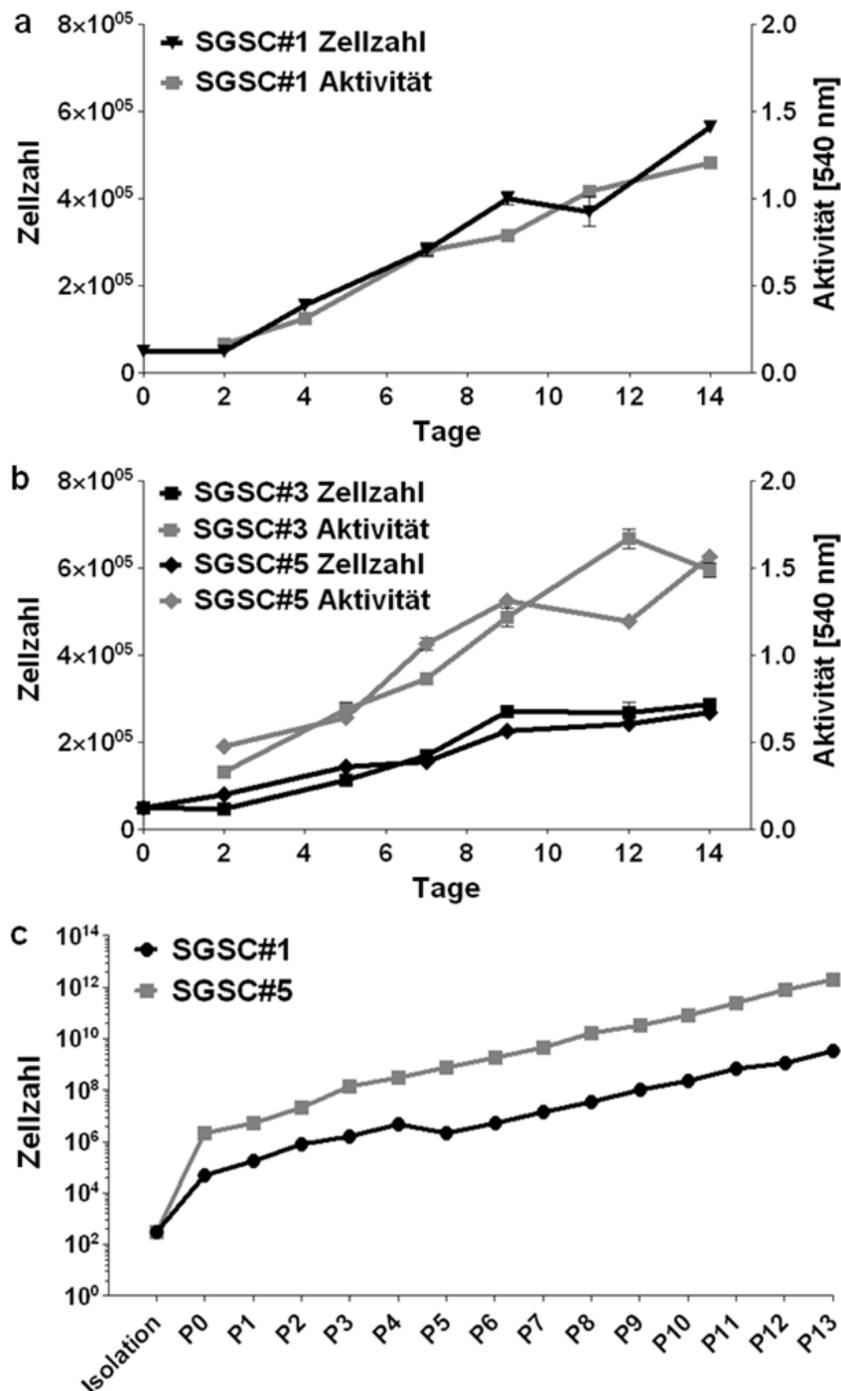


Abbildung 18: Wachstumseigenschaften der SGSCs. a) Wachstum der SGSC#1 über 14 Tage, gemessen an der Zellzahl und der Aktivität zu sechs Zeitpunkten. Die SGSC#1 zeigten eine Stagnation der Proliferation nach dem Erreichen der Konfluenz an Tag 9 und einen erneuten Anstieg der Proliferation ab Tag 11. Die Aktivität stieg über die Zeit kontinuierlich an. b) Wachstum der SGSC#3 und #5 über 14 Tage, gemessen an der Zellzahl und der Aktivität zu sechs Zeitpunkten. Im Vergleich zu den SGSC#1 (bisheriges Isolationsprotokoll) zeigten die SGSC#3 und #5 (optimiertes Isolationsprotokoll) nur eine geringe Stagnation der Proliferation nach dem Erreichen der Konfluenz an Tag 7. Nach dem erneuten Anstieg der Proliferation erreichten sie die Plateauphase. Die Zellzahl der SGSC#3 und #5 lag deutlich unter der der SGSC#1, die Aktivität lag hingegen höher. c) Langzeitproliferation der SGSCs von der Isolation bis zur Passage 13. Vergleich der SGSC#1 mit den SGSC#5. Bei den SGSC#5 konnte nach der optimierten Isolation eine größere initiale Zellmenge gewonnen werden. Nach der Isolation zeigten beide Zellpopulationen ähnliche Langzeitproliferationseigenschaften. $n=3$, *standard error of the mean* (SEM)

3.3.2 Spontanes Differenzierungspotential

Adulte Stammzellen haben abhängig von ihrem Ursprungsgewebe und ihren Kultivierungsbedingungen, ein unterschiedliches Differenzierungspotential. Dieses reicht von unipotent bis zu pluripotent. Zur Untersuchung des spontanen Differenzierungspotentials der SGSCs wurden diese molekularbiologisch und proteinbiochemisch auf die Expression bestimmter Stammzellmarker und Marker für Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter über mehrere Passagen analysiert. Ein umfassendes Gen- und Proteinexpressionsprofil der spontanen Differenzierung der SGSCs wurde mittels qPCR, immunzytochemischer Fluoreszenzfärbungen und einem TF-Chip erstellt.

3.3.2.1 Genexpressionsanalysen

Zur Analyse der Genexpression wurde die qPCR verwendet. Zur Untersuchung der ausgewachsenen Zellen aus den Schweißdrüsen und der entscheidenden Transkripte bei diesem Prozess, wurde die Genexpressionsänderung zwischen der *in situ* und *in vitro* Situation untersucht. Dazu wurde das relative Genexpressionslevel von frisch isolierten Schweißdrüsen mit dem der SGSCs in Passage 0 verglichen (Abb. 19a). Dabei zeigte sich, dass Nestin, abhängig von der untersuchten Zellpopulation, in seiner Expression zwischen einer geringen Zunahme und einer Abnahme schwankte. Eine Expressionsverringerung war bei den Keratinen sowie den Schweißdrüsen-assoziierten Transkripten (K7, K14, K19, K77, Mucin, CEA) zu verzeichnen. Des Weiteren wurde Ki67 vermehrt von den SGSCs der Passage 0 gegenüber den *in situ* Schweißdrüsen exprimiert.

Zur Untersuchung der qualitativen Genexpression zwischen den *in situ* Schweißdrüsen, den SGSCs in der Passage 0 und der Passage 14 wurden die Produkte der qPCR in einer Kapillargelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt (Abb. 19b). Dabei konnten bei den *in situ* Schweißdrüsen und den SGSCs sowohl Stammzell-assoziierte Transkripte als auch Transkripte von Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter nachgewiesen werden. Auf welche in der quantitativen Genexpressionsanalyse näher eingegangen wird. Zwischen den *in situ* Schweißdrüsen und den SGSCs in Passage 0 zeigte sich eine übereinstimmende qualitative Genexpression. Im Vergleich der SGSCs in Passage 0 und der Passage 14 konnte eine qualitative Genexpressionsänderung detektiert werden. Das Schweißdrüsen-assoziierte Transkript K77 wurde von den SGSCs in der Passage 0

noch exprimiert, aber nicht mehr in späteren Passagen. Eine qualitative Änderung der Genexpression der SGSC#1, #2 und #3 zwischen den Passagen 8, 14 und 21 konnte nicht detektiert werden. Die kongruenten Gelbilder der Passage 8, 14 und 21 wurden hier exemplarischen durch die Passage 14 dargestellt.

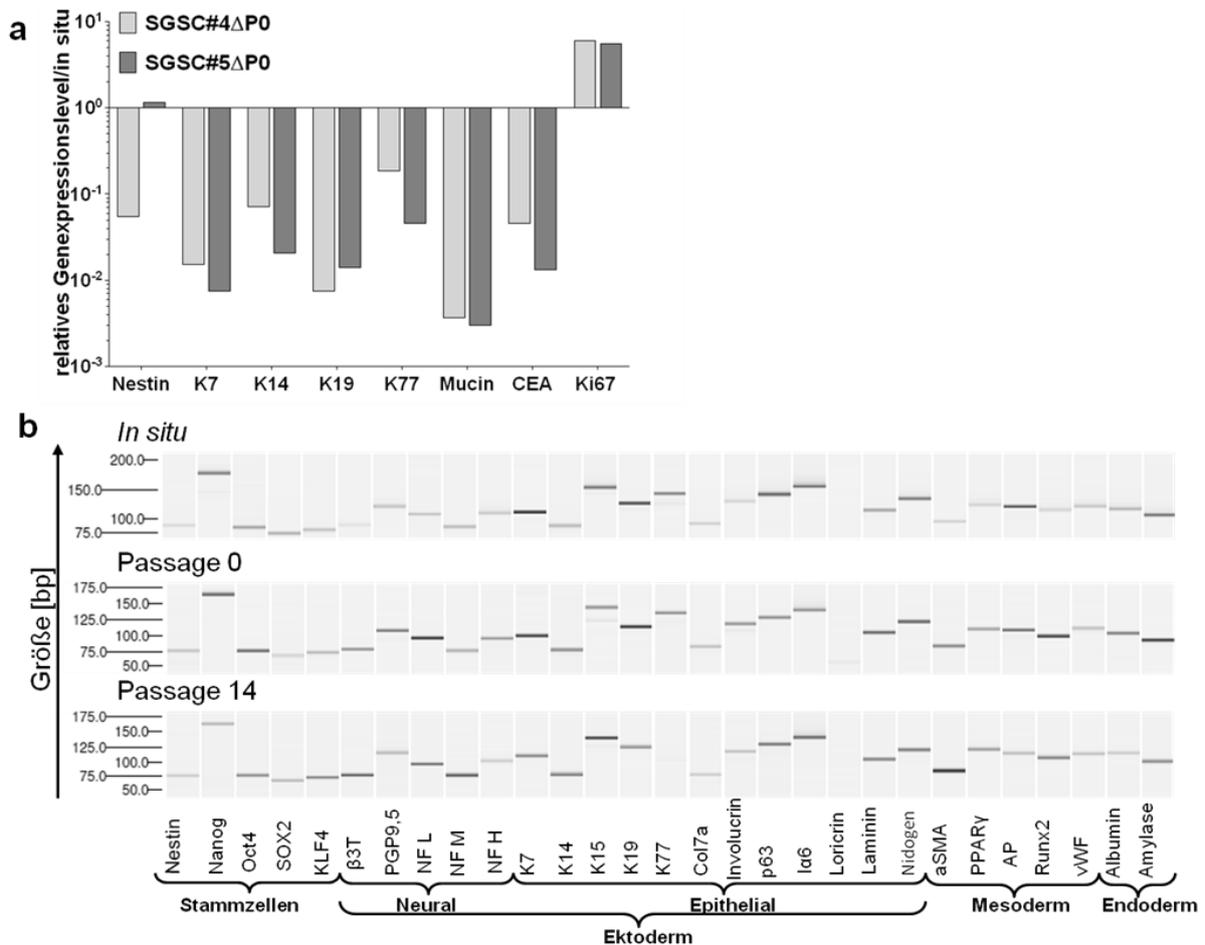


Abbildung 19: Genexpressionsänderung bei der Gewinnung der SGSCs. a) Genexpressionsprofil von frisch isolierten Schweißdrüsen im Vergleich zu SGSCs in Passage 0. Die Expression von Stammzell- und Schweißdrüsen-assoziierten Transkripten war in der Passage 0 im Vergleich zu den *in situ* Schweißdrüsen verringert. b) Kapillargelelektrophorese der *in situ* Schweißdrüsen und der SGSCs in den Passagen 0 und 14 im Vergleich. Qualitativ konnte keine Genexpressionsänderung zwischen den *in situ* Schweißdrüsen und der Passage 0 nachgewiesen werden. Eine Änderung in der qualitativen Genexpression zeigte sich aber im Vergleich der Passagen 0 und der Passage 14. K77 wurde *in situ* und der Passage 0 noch exprimiert, aber nicht mehr in späteren Passagen.

Zur Einschätzung der multipotenten Differenzierungskapazität der SGSCs wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse in den Passagen 8, 14 und 21 der SGSC#1, #2 und #3 durchgeführt (Abb. 20). Die multipotenten Stammzeleigenschaften der SGSCs konnten durch die Expression verschiedener Stammzell-assoziiierter Transkripte (Nestin, Nanog, Oct4, SOX2, KLF4) verifiziert werden (Abb. 20a).

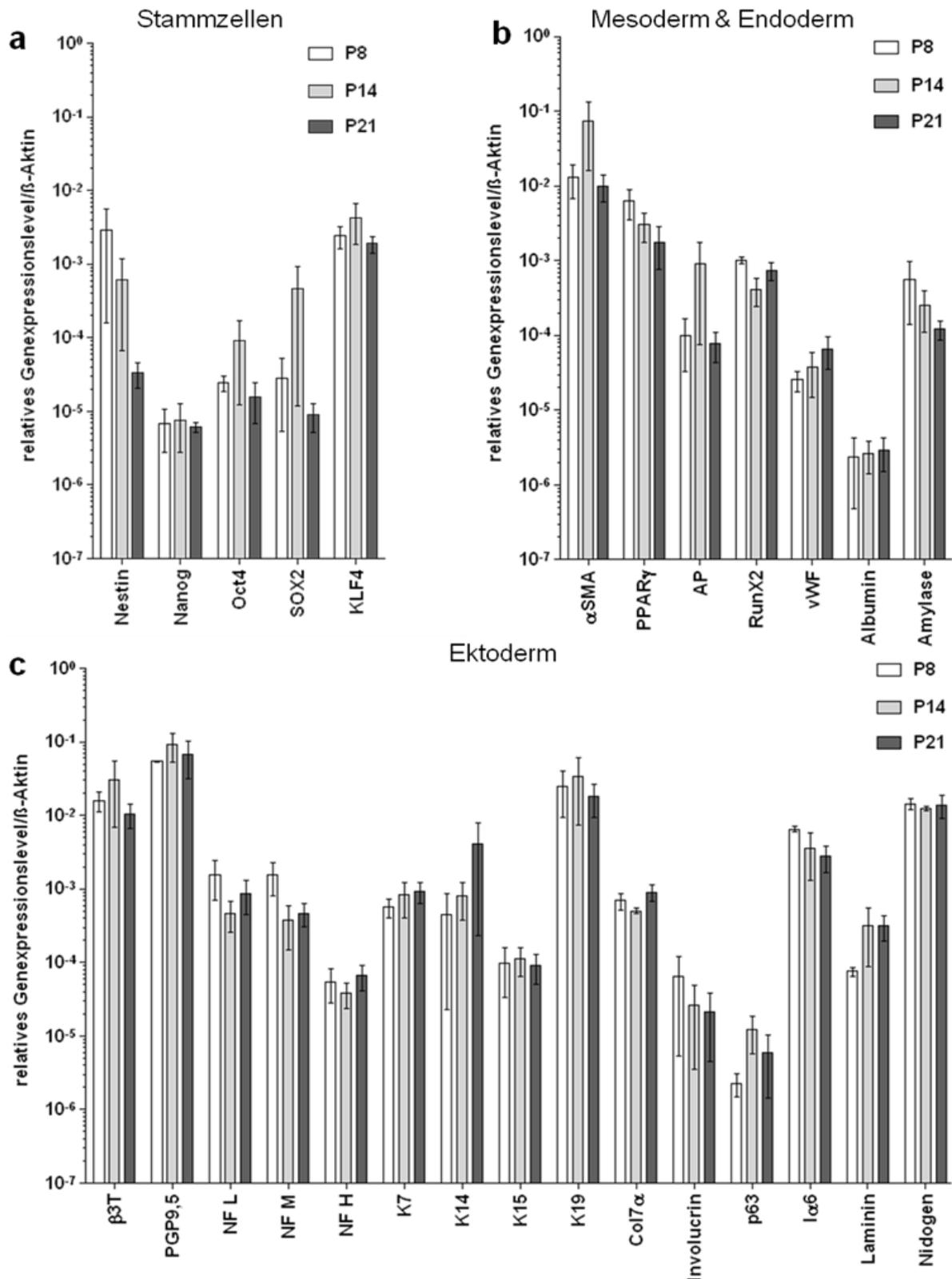


Abbildung 20: Genexpressionsänderung der SGSCs über die Kultivierungszeit. a) Die SGSCs in den Passagen 8, 14 und 21 exprimierten Stammzell-assoziierte Transkripte b) spezifische Transkripte von Zelltypen des Mesoderms und des Endoderms und c) spezifische Transkripte von Zelltypen des Ektoderms. Die quantitative Genexpression blieb über die Passagen, ausgenommen der natürlich auftretenden Fluktuationen des relativen Genexpressionslevels, konstant und zeigte keine signifikanten Genexpressionsänderungen. n=3, SEM

Weiterhin wurden Transkripte spezifisch für Zelltypen des Ektoderms (β 3T, PGP 9,5, NF L, NF M, NF H), des Mesoderms (α SMA, PPAR γ , AP, RunX2, vWF) und des Endoderms (Albumin, Amylase) nachgewiesen (Abb. 20b,c).

Aufgrund der möglichen Anwendung der SGSCs in der Wundheilung lag außerdem ein besonderer Fokus auf der Expression epithelialer Transkripte. Es konnten eine Reihe von Haut- und Schweißdrüsen-assoziierten Transkripten wie Keratinen (K7, K14, K15, K19) und Transkripten spezifisch für bestimmte Zelltypen der Haut (Col7 α , Involucrin, p63, Laminin, Nidogen) nachgewiesen werden (Abb. 20c).

Die quantitative Genexpression blieb über die Passagen 8, 14 und 21, ausgenommen der natürlich auftretenden Fluktuationen des relativen Genexpressionslevels, konstant und zeigte keine signifikanten Genexpressionsänderungen (siehe Kapitel 2.2.6). Die Genexpressionsanalyse wies somit ein spontanes, multipotentes Differenzierungspotential der SGSCs *in vitro* nach, welches keiner passagenabhängigen Genexpressionsänderung unterlag.

3.3.2.2 Proteinexpressionsanalysen

Zur Untersuchung des multipotenten Differenzierungspotentials und zur Verifizierung der analysierten Genexpression wurde die Expression Stammzell-assoziiierter Proteine und Proteine, die von speziellen Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter exprimiert werden, analysiert. Ein umfassendes Proteinexpressionsprofil der spontanen Differenzierung der SGSCs wurde mittels immunzytochemischer Fluoreszenzfärbungen und eines TF-Chips erstellt.

3.3.2.2.1 Immunzytochemischer Nachweis des spontanen Differenzierungspotentials

Eine immunzytochemische Proteinexpressionsanalyse der SGSCs wurde, identisch zur Genexpressionsanalyse, in den Passagen 8, 14 und 21 der Zellpopulationen SGSC#1, #2 und #3 durchgeführt. Alle drei Zellpopulationen zeigten die Expression der charakteristischen Stammzellproteine Oct4, SOX2, Nanog, Nucleostemin und Nestin (Abb. 21a). Zusätzlich exprimierten die SGSCs spontan Proteine von Zelltypen aller 3 embryonalen Keimblätter (Mesoderm: AP, Ektoderm: NF, Endoderm: Amylase) (Abb. 21b). Die Expression dieser Proteine verifizierte die Genexpressionsanalyse. Damit konnte auf Gen- und Proteinebene gezeigt werden, dass SGSCs ein spontanes, multipotentes Differenzierungspotential besitzen.

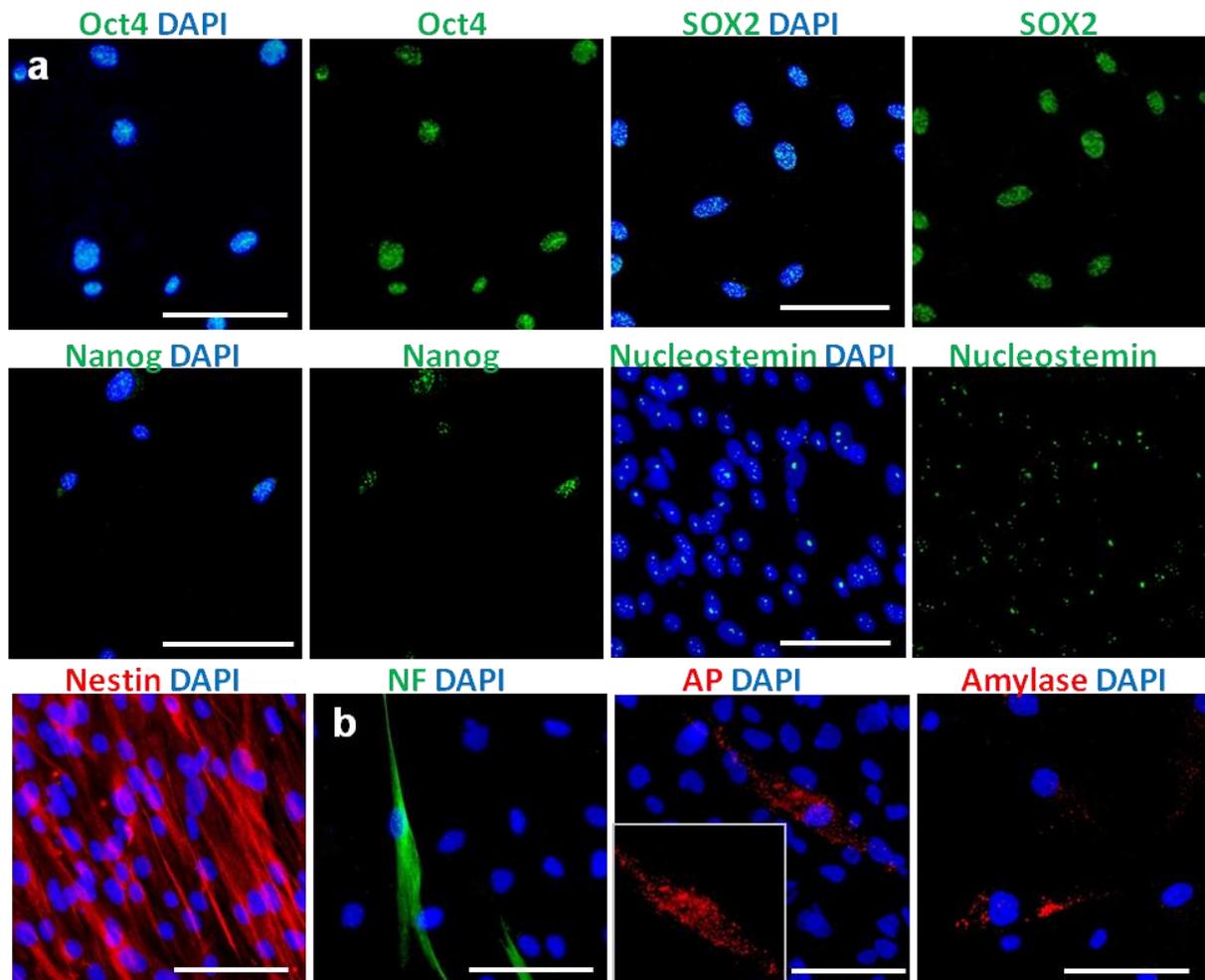


Abbildung 21: Immunzytochemischer Nachweis des spontanen Differenzierungspotentials. a) Die SGSCs exprimierten die Stammzell-assoziierten Proteine Oct4, SOX2, Nanog, Nucleostemin und Nestin. b) Zusätzlich exprimierten die SGSCs Proteine von Zelltypen aller 3 embryonalen Keimblätter (Mesoderm AP, Ektoderm NF, Endoderm Amylase). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab entspricht 100 μm

3.3.2.2.2 Expression aktivierter Transkriptionsfaktoren

Die Gen- als auch die Proteinexpression sind stark regulierte Prozesse, welche nicht in jedem Fall zu einem aktivierten Protein führen. Deshalb wurden die SGSCs zusätzlich zur Analyse der Gen- und Proteinexpression mithilfe des TF-Chips auf aktivierte TF untersucht. Für die SGSC#1 und #2 konnten aktivierte TF für die Proliferation (*signal transducer and activator of transcription 3* (Stat3)) und die mesodermale Differenzierungsrichtung (Adipogen; *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), *CCAAT-enhancer-binding protein β* (C/EBP β) Myogen; MyoD, *myocyte enhancer factor-2* (MEF2)) nachgewiesen werden (Abb. 22). Zudem konnte der Tumorsuppressor p53 detektiert werden. Zwischen den Zellpopulationen SGSC#1 und SGSC#2 variierten die aktivierten TF qualitativ und quantitativ.

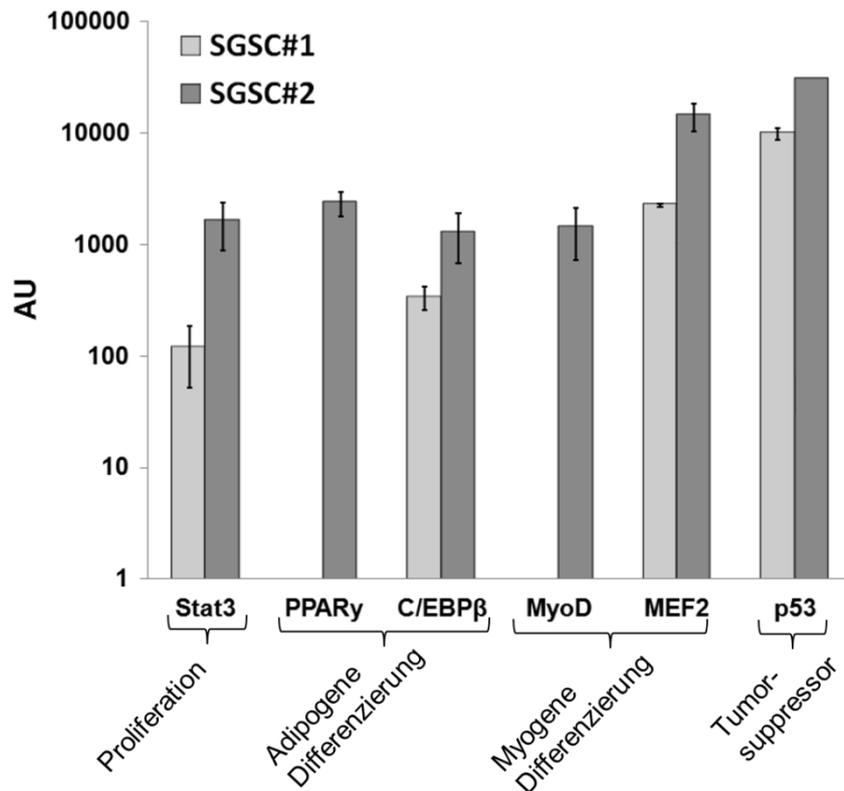


Abbildung 22: Expression aktivierter Transkriptionsfaktoren. Für die SGSCs wurden aktivierte Transkriptionsfaktoren (TF) für die Proliferation (Stat3) und die mesodermale Differenzierungsrichtung (Adipogen; PPAR γ , C/EBP β , Myogen; MyoD, MEF2) nachgewiesen. Zudem konnte der Tumorsuppressor p53 detektiert werden. Zwischen den Zellpopulationen SGSC#1 und #2 variierten die aktivierten TF qualitativ und quantitativ. *arbitrary units*-AU, n=3, SEM

Im Gegensatz zu den SGSC#2 konnten bei den SGSC#1 keine aktivierten TF für PPAR γ und MyoD detektiert werden. Desweiteren war die Quantität der aktivierten TF bei den SGSC#1 geringer als bei den SGSC#2. Bei beiden Zellpopulationen konnten mit dieser Methode keine aktivierten TF für die osteogene Differenzierung (RunX2), die endodermale Differenzierung (Gata-4, HNF 1 α/β , 3 α , 4 α (*hepatocyte nuclear factor 1 α/β , 3 α , 4 α*)) und die Pluripotenz (Oct4) nachgewiesen werden. Für die SGSCs konnte somit gezeigt werden, dass sie spontan aktivierte TF für die Proliferation, die mesodermale Differenzierungsrichtung und die Tumorsuppression exprimierten.

3.3.3 Generierung von Stammzellklonen

Ein klassisches Kriterium zur Einschätzung der Stammzellartigkeit von Zellen ist ihr Vermögen Zellklone zu bilden. Durch die Herstellung proliferierender Zellklone aus Einzelzellen, konnte das Stammzellpotential der SGSCs nachgewiesen werden (Abb. 23). Durch die Verdünnung der Zellsuspension auf Einzelzellkonzentration und einer

mikroskopischen Verfolgung der Einzelzellen konnten 3 Zellklone identifiziert werden. Alle 3 Zellklone proliferierten über mehrere Passagen, zeigten die typische Morphologie der SGSCs (Abb. 23a) und exprimierten das charakteristische Protein Nestin (Abb. 23b). Zusätzlich konnten mithilfe der qPCR Stammzell-assoziierte Transkripte und Transkripte von Zelltypen aller 3 embryonalen Keimblätter bei den Zellklonen nachgewiesen werden (Abb. 23c). Das Potential der SGSCs Zellklone zu bilden konnte somit nachgewiesen werden. Diese Zellen proliferierten, exprimierten Nestin und zeigten zudem eine Genexpression wie die initiale Zellpopulation.

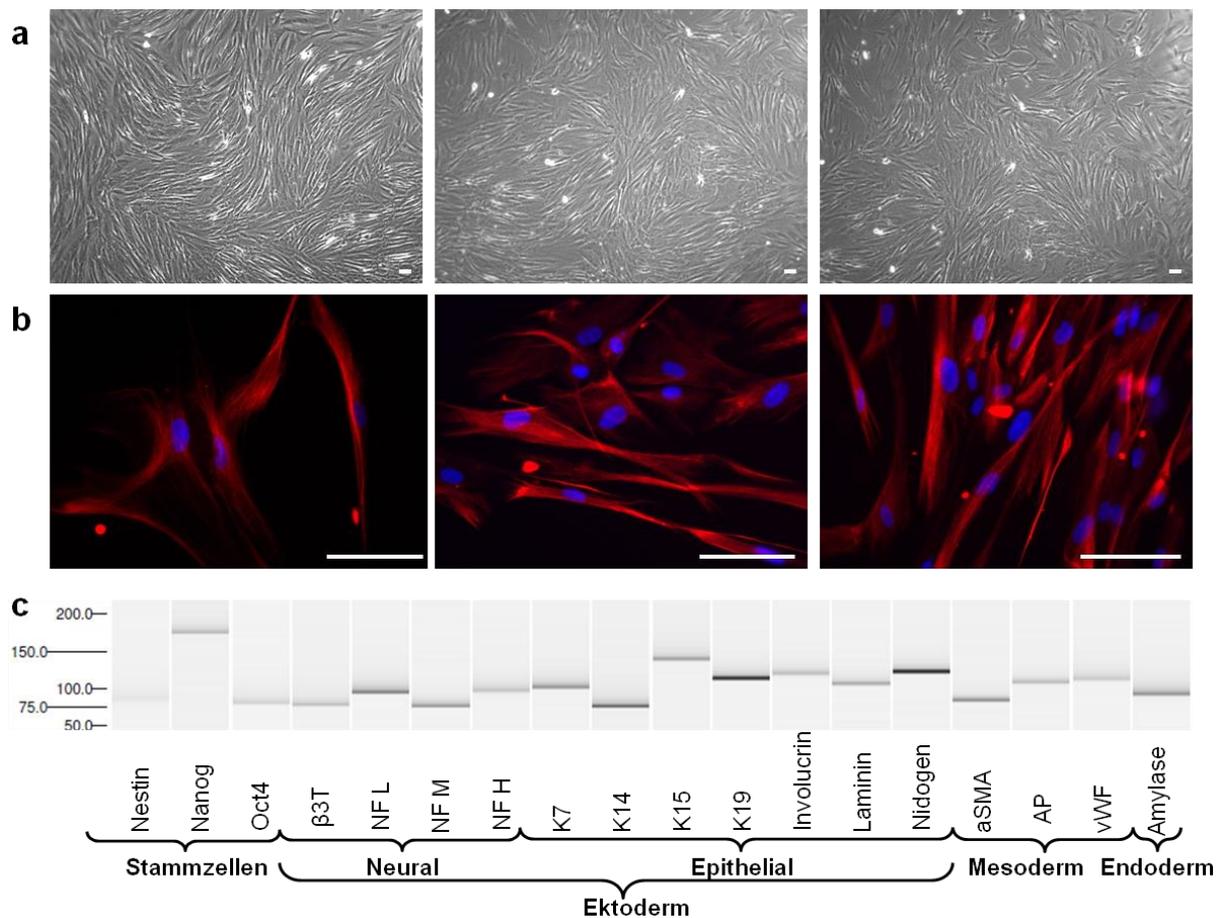


Abbildung 23: Generierung von Zellklonen. a) Mikroskopische Durchlichtaufnahmen der 3 Zellklone der SGSCs. Alle 3 Zellklone proliferierten und zeigten die typische spindelförmige Morphologie der SGSCs. b) Eine immunzytochemische Fluoreszenzfärbung detektierte in allen 3 Zellklonen das charakteristische Protein Nestin. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab entspricht 100 μ m c) In einer qualitativen Genexpressionsanalyse der Zellklone konnten sowohl Stammzell-assoziierte Transkripte als auch Transkripte von Zelltypen aller 3 embryonaler Keimblätter nachgewiesen werden.

3.4 Vergleich der SGSCs mit Haut-abgeleiteten Zellpopulationen und bereits etablierten Stammzelllinien

Zur Untersuchung des Ursprungs, einer möglichen *in situ* Funktion und des Differenzierungspotentials wurden die SGSCs mit Haut-abgeleiteten Zellpopulationen und bereits etablierten, adulten Stammzelllinien verglichen. Zur Gegenüberstellung mit Stammzellen aus dem Ektoderm wurden epidermale Stammzellen (*epidermal stem cells*, EpiSCs) verwendet. Als Zellen des Mesoderms wurden Knochenmarkstammzellen (*bone marrow stem cells*, BMSCs) und dermale Fibroblasten eingesetzt.

3.4.1 Vergleich der spontanen Proteinexpression

In einer immunzytochemischen Fluoreszenzfärbung wurde die spontane Nestin Expression der EpiSCs, der BMSCs und der dermalen Fibroblasten untersucht und mit den SGSCs verglichen. Zusätzlich wurde eine umfassende immunzytochemische Proteinexpressionsanalyse der EpiSCs im Vergleich zu den SGSCs durchgeführt und mit der *in situ* Proteinexpression verschiedener Stammzellnischen der Haut verglichen. Außerdem wurden die BMSCs und die SGSCs mithilfe einer Durchflusszytometrie auf die Oberflächenproteinexpression typischer mesenchymaler Stammzellen untersucht.

3.4.1.1 Vergleich der Nestin Expression

Das Intermediärfilament Nestin ist das entscheidende Charakteristikum der SGSCs. Zum Vergleich und zur Abgrenzung der SGSCs gegenüber Haut-abgeleiteten Zellpopulationen und bereits etablierten Stammzelllinien wurde eine vergleichende Nestin Expressionsuntersuchung durchgeführt (Abb. 24). Während die SGSCs Nestin in ca. 90 % der Zellen exprimierten, zeigten die EpiSCs, die BMSCs und die dermalen Fibroblasten nahezu keine spontane Nestin Expression *in vitro*. Somit ist Nestin ein stabiles und kennzeichnendes Protein der SGSCs.

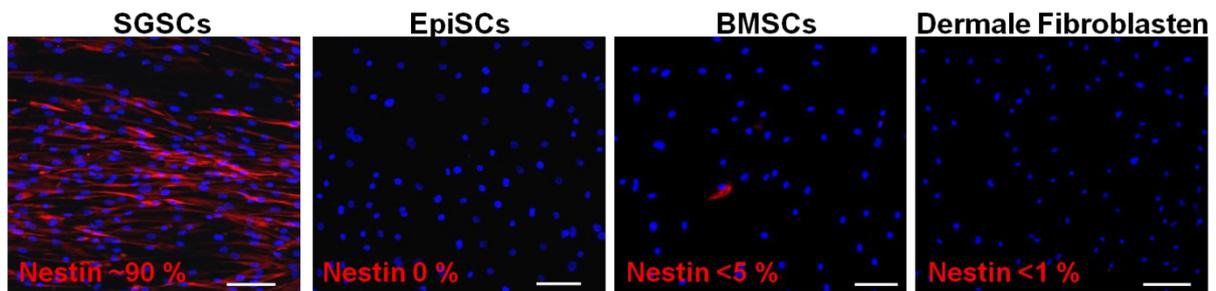


Abbildung 24: Nestin Expression unterschiedlicher Zellpopulationen. Bis zu 90 % der SGSCs exprimierten spontan Nestin. Sowohl die EpiSCs als auch die BMSCs und die dermalen Fibroblasten zeigten keine oder nur eine sehr geringe, spontane Nestin Expression *in vitro*. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 µm

3.4.1.2 Vergleich der *in vitro* und *in situ* Proteinexpression

In einer umfassenden immunzytochemischen Untersuchung wurde die Proteinexpression der SGSCs mit den EpiSCs verglichen. Zusätzlich zur *in vitro* Analyse wurde die Proteinexpression verschiedener Hautkompartimente untersucht und mit der Expression der Zellpopulationen verglichen. Besonderes Interesse galt dabei den Stammzellnischen der Schweißdrüsen, der Epidermis und der Haarfollikel. Aufgrund des möglichen Einsatzes der SGSCs für die Wundheilung, lag ein besonderer Fokus auf der Expressionsanalyse von Haut- und Schweißdrüsen-assoziierten Proteinen (Abb. 25).

Die Keratine 7 und 19 wurden von den SGSCs und den EpiSCs *in vitro* exprimiert. In gesunder adulter Haut werden diese Proteine nur in Schweißdrüsen, sowohl in den sezernierenden Kompartimenten der ekkrinen als auch der apokrinen Schweißdrüsen exprimiert. K14, ein Protein mehrschichtigen Epithels, wurde von den EpiSCs sehr stark exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimierten die SGSCs kein K14. In den Schweißdrüsen konnte K14 in den ausführenden Kompartimenten als auch in den myoepithelialen Zellen, welche den sezernierenden Anteil umgeben, nachgewiesen werden. In der Epidermis wurde K14 von den basalen und suprabasalen Zellen exprimiert. Im Haarfollikel konnte K14 in Zellen der äußeren Haarwurzelscheide gezeigt werden.

Als Adhäsionsprotein konnte Integrin alpha 6 ($\alpha 6$) in allen untersuchten Hautkompartimenten und Zellpopulationen nachgewiesen werden. Bei den SGSCs konnte $\alpha 6$ auf der gesamten Zelloberfläche detektiert werden. Dabei zeigten sich starke Expressionsunterschiede zwischen den Zellen der SGSCs. Bei den EpiSCs konnte $\alpha 6$ überwiegend an den Zell-Matrix-Kontakten nachgewiesen werden.

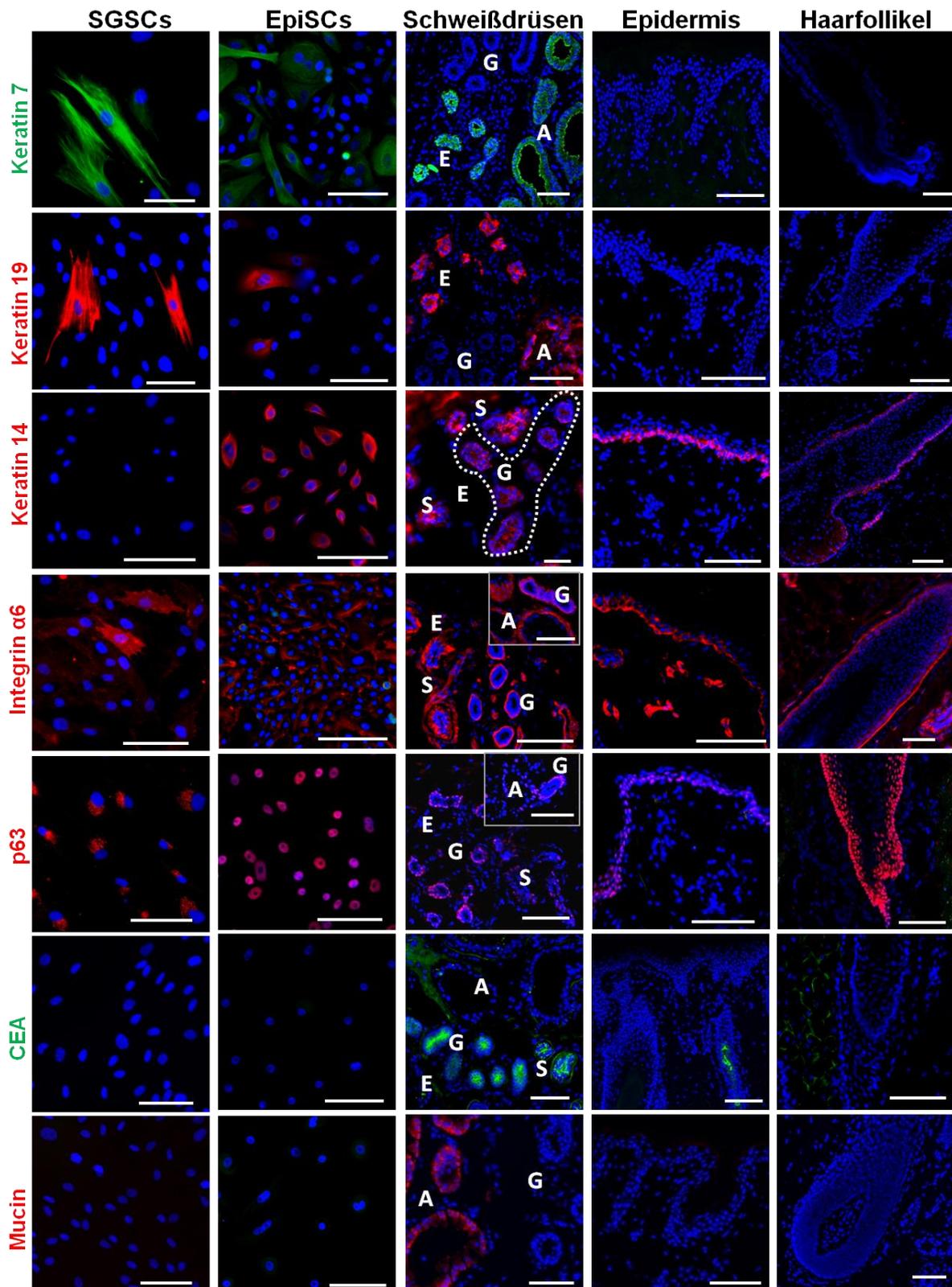


Abbildung 25: Proteinexpressionsanalyse der SGSCs im Vergleich zu den EpiSCs und den Stammzellnischen der Achselhaut. Immunzytochemische Untersuchung der Proteinexpression der SGSCs (1. Reihe) im Vergleich zu den EpiSCs (2. Reihe) und den Stammzellnischen der Achselhaut wie der Schweißdrüsen (3. Reihe), der Epidermis (4. Reihe) und der Haarfollikel (5. Reihe). Die SGSCs exprimierten, wie die EpiSCs, K7, K19 und Id6. Bei den SGSCs waren keine Proteine mehrschichtigen Epithels (K14) nachweisbar. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 μ m A-apokrine Schweißdrüsen, E-ekkrine Schweißdrüsen, G-Gang, S-sezernierendes Endstück

In den Schweißdrüsen konnte $\alpha 6$ in den basalen und myoepithelialen Zellen, in den luminalen Zellen der ekkrinen Schweißdrüsen, aber auch in Zellen des Schweißdrüsenmesenchyms gezeigt werden. In der Epidermis und im Haarfollikel wurde $\alpha 6$ von basalen Zellen exprimiert.

Ein weiteres Protein der basalen Zellen ist p63. Es konnte sowohl in den SGSCs als auch den EpiSCs detektiert werden. Bei den SGSCs konnte die Expression jedoch nur im endoplasmatischen Retikulum detektiert werden. p63 liegt funktionell aber nur im Zellkern vor. *In situ* konnte p63 in den basalen und myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsen nachgewiesen werden. In der Epidermis und im Haarfollikel wird p63 von den basalen Zellen exprimiert. Die Schweißdrüsen-assoziierten Proteine CEA und Mucin wurden weder von den SGSCs noch den EpiSCs exprimiert. CEA konnte in der Haut in den sezernierenden und ausführenden Kompartimenten der ekkrinen Schweißdrüsen detektiert werden. Mucin konnte hingegen nur in den sezernierenden Zellen der apokrinen Schweißdrüsen nachgewiesen werden. CEA und Mucin wurden weder von Zellen der Epidermis noch von Zellen des Haarfollikels exprimiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die SGSCs im Vergleich zu den EpiSCs ähnliche Proteine für einfaches Epithel (K7, K19) und Proteine von Zelltypen der Basalmembran ($\alpha 6$, p63) exprimierten. Hingegen konnten bei den SGSCs keine Proteine für Zellen des mehrschichtigen Epithels (K14) detektiert werden.

3.4.1.3 Vergleich der Oberflächenproteinexpression

Zur Untersuchung der Oberflächenproteine der *in vitro* kultivierten Zellen wurden die SGSCs und die BMSCs mithilfe einer direkten immunzytochemischen Fluoreszenzfärbung markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Untersucht wurden die charakteristischen mesenchymalen Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44 und CD105. In Abbildung 26a ist die Oberflächenexpression der SGSC#1 der Passage 21 exemplarisch dargestellt. Zur Darstellung der prozentualen Proteinexpression wurde ein Histogramm mit einer Überlagerung der gefärbten Zellen (hell grauer Peak) mit der entsprechenden Isotypkontrolle (dunkel grauer, ausgefüllter Peak) erstellt (siehe Kapitel 2.2.4.3). Die SGSCs zeigten die Expression der mesenchymalen Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44 und CD105.

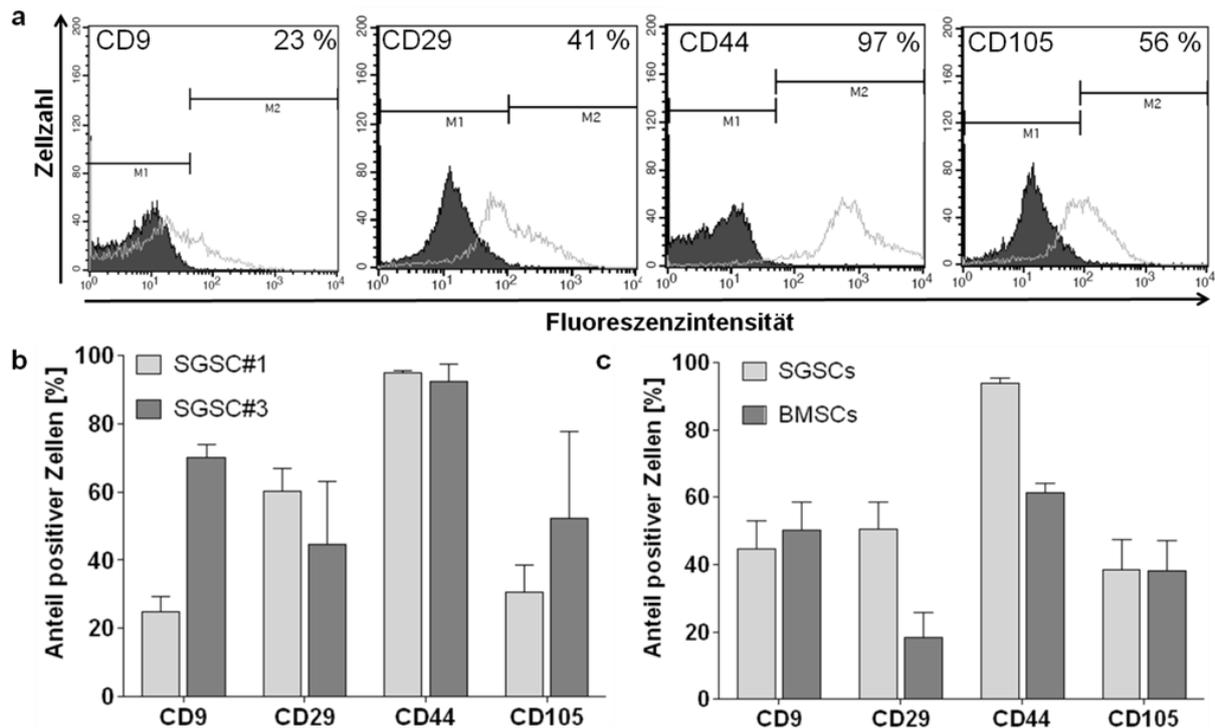


Abbildung 26: Expressionsanalyse der Oberflächenproteine der SGSCs im Vergleich zu den BMSCs. a) Exemplarisches Expressionsprofil der SGSC#1 der Passage 21. Zur Darstellung der prozentualen Proteinexpression wurde ein Histogramm mit einer Überlagerung der gefärbten Zellen (hell grauer Peak) mit der entsprechenden Isotypkontrolle (dunkel grauer, ausgefüllter Peak) erstellt. Die SGSCs exprimierten CD9, CD29, CD44 und CD105. b) Analyse der prozentualen Oberflächenproteinexpression der SGSC#1 und #3 in den Passagen 8, 14 und 21. Das Expressionsprofil der SGSCs änderte sich nicht über die Passagen, aber der prozentuale Anteil positiver Zellen variierte sowohl zwischen den Passagen als auch zwischen den Zellpopulationen der SGSC#1 und #3. c) Vergleich der Oberflächenproteinexpression zwischen den SGSCs (#1 und #3) und den BMSCs. Die SGSCs exprimierten wie die BMSCs CD9, CD29, CD44 und CD105. n=3, SEM

Das Expressionsprofil der SGSCs änderte sich nicht über die Passagen 8, 14 und 21, aber der prozentuale Anteil positiver Zellen variierte sowohl zwischen den Passagen als auch den SGSC#1 und SGSC#3 (Abb. 26b). Die Expressionsunterschiede zeigten sich besonders bei den Oberflächenproteinen CD9, CD29 und CD105. Das hoch exprimierte Protein CD44 schwankte in seiner Expression dagegen nur sehr gering. Verglichen wurde das Expressionsprofil der SGSCs mit dem der BMSCs (Abb. 26c). Die BMSCs exprimierten wie die SGSCs CD9, CD29, CD44 und CD105. Die Analyse wurde in den Passagen 12 bis 16 durchgeführt, in denen auch die anderen Experimente erfolgten. Im Vergleich zwischen den SGSCs und den BMSCs konnte ein ähnliches Oberflächenproteinexpressionsprofil dokumentiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Expression von CD29 als auch CD44 bei den BMSCs schwächer war als bei den SGSCs. CD9 und CD105 wurden dagegen ähnlich stark exprimiert.

3.4.2 Induzierbarkeit der SGSCs

Mithilfe der *in vitro* Charakterisierung konnte das spontane Differenzierungspotential der SGSCs in Zelltypen aller 3 embryonalen Keimblätter gezeigt werden.

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der SGSCs in spezialisierte Zelltypen wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Zum einen erfolgte die induzierte Differenzierung der SGSCs durch veränderte Kultivierungsbedingungen mittels organotypischer 3D Zellkultivierung in sogenannten *organoid bodies* (OBs). Zum anderen wurde eine Induktion der Mesodermdifferenzierung durch eine Modifikation der Zellkulturmedien mittels löslicher Faktoren erreicht. Zum Vergleich wurde die Mesodermdifferenzierung simultan mit den BMSCs durchgeführt.

3.4.2.1 Ektodermale Differenzierung mittels organotypischer 3D Zellkultivierung

Die organotypische 3D Zellkultivierung ist eine Methode bei der die SGSCs zur Aggregation und Differenzierung in Zellaggregaten, sogenannten OBs, induziert werden. Die Differenzierung erfolgte ohne Zugabe von speziellen Differenzierungsfaktoren und wurde maßgeblich durch die veränderte Kultivierung induziert. Die Methode der 3D Kultivierung wurde zur Nachbildung der *in vivo* Situation verwendet. Dadurch sollte versucht werden, die Stammzellnische der Schweißdrüsenzellen in der Haut *in vitro* zu imitieren und deren Differenzierung zu beeinflussen.

Mithilfe der 3D Kultivierung konnte eine Differenzierung der SGSCs induziert werden (Abb. 27). Dazu wurden die vorher generierten OBs (Kapitel 2.2.5.1) mithilfe von Gelatine am Zellkulturboden immobilisiert und kultiviert (Abb. 27a oben). Die OBs und die auswachsenden Zellen (Abb. 27a unten) wurden auf ihre Gen- und Proteinexpression untersucht. Die Genexpressionsanalyse detektierte Stammzell-assoziierte Transkripte sowie Transkripte von Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter (Abb. 27b). Der Vergleich der Genexpression zwischen der organotypischen 3D Kultivierung und der 2D Kultivierung der SGSCs zeigte eine erhöhte Expression neuronaler (NF L, NF M, NF H) und epithelialer Transkripte (Col7 α und Involucrin).

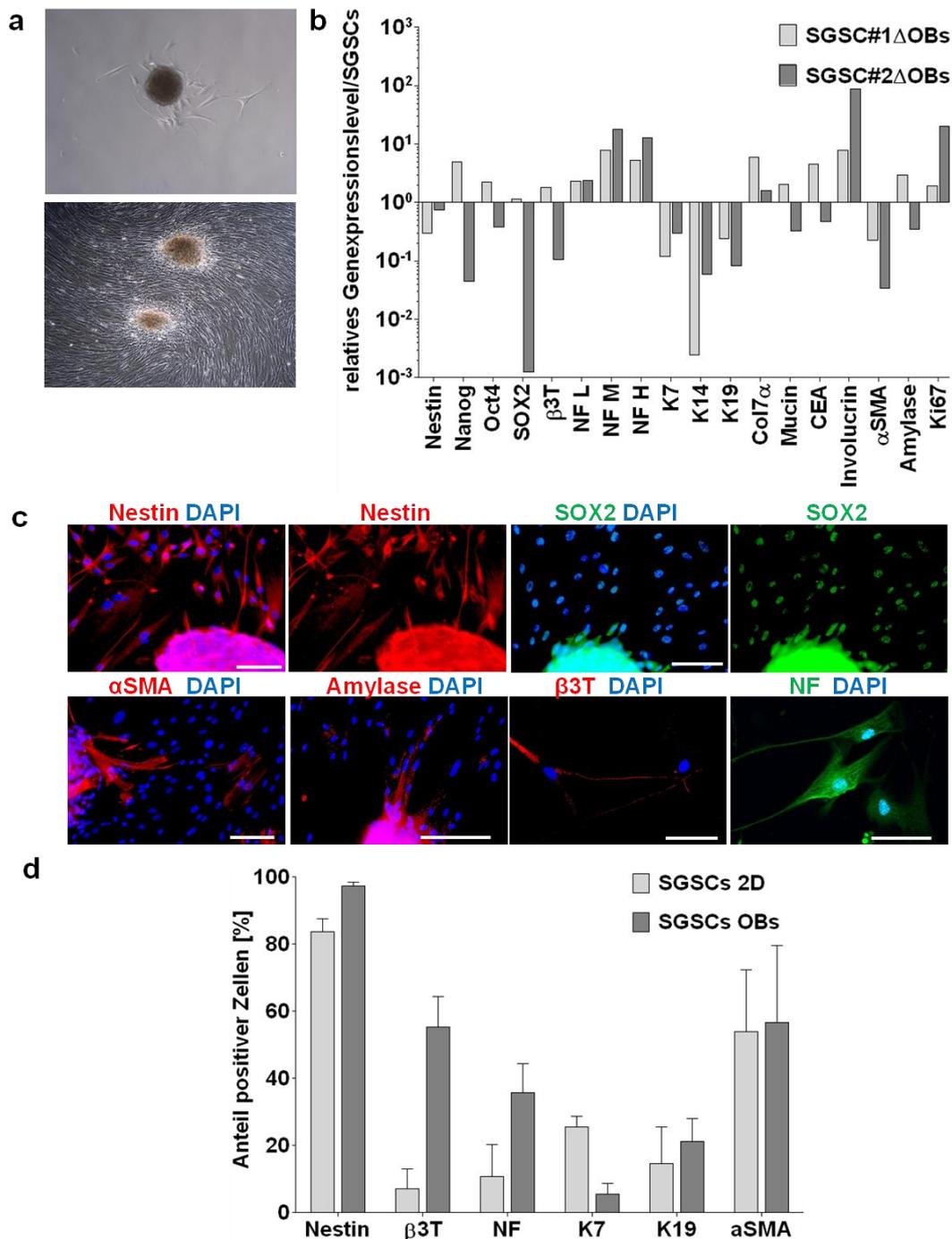


Abbildung 27: Ektodermale Differenzierung mittels organotypischer 3D Zellkultivierung. a) Oben: Zellen begannen aus den *organoid bodies* (OBs) zu migrieren. Unten: Die Kultivierung der OBs erfolgte bis zum Erreichen der Konfluenz. b) Die Analyse der Genexpression detektierte Stammzell-assoziierte Transkripte sowie Transkripte von Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter. Der Vergleich der Genexpression zwischen der 3D Kultivierung und der 2D Kultivierung der SGSCs zeigte eine erhöhte Expression neuronaler (NF L, NF M, NF H) und epithelialer Transkripte (Col7a und Involutrin). c) Die Detektion verschiedener Proteine mittels immunzytochemischer Fluoreszenzfärbungen war qualitativ identisch zu den 2D kultivierten SGSCs. Es konnte die Expression von Stammzell-assoziierten Proteinen (Nestin, SOX2) sowie Proteinen von Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter (Mesoderm: αSMA, Endoderm: Amylase, Ektoderm: β3T, NF) nachgewiesen werden. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 μm d) Mithilfe einer quantitativen Erfassung des prozentualen Anteils positiver Zellen der 2D im Vergleich zur 3D Kultivierung, konnte eine induzierte neuronale Differenzierung der SGSCs in OBs dokumentiert werden. Dabei zeigte sich ein Anstieg der β3T und NF exprimierenden Zellen um mehr als 50 % bzw. 20 %. n=2, SEM

Die Genexpression von Nestin sank leicht ab. Die Stammzell-assoziierten Transkripte von Nanog, Oct4 und SOX2 variierten zwischen einem Anstieg und einem Abfall der Expression bei den untersuchten Zellpopulationen. Die Genexpression von K7, K14 und K19 sank bei beiden Zellpopulationen, während die Genexpression von Mucin und CEA zwischen den Zellpopulationen variierte. Die Expression der Transkripte von α SMA sank, dagegen stieg die Expression der Transkripte von Ki67 an. Die Proteindetektion mittels immunzytochemischer Fluoreszenzfärbungen war qualitativ identisch zu den 2D kultivierten SGSCs (Abb. 27c). Es konnte die Expression Stammzell-assoziiierter Proteine (Nestin, SOX2) sowie Proteine von Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter (Mesoderm: α SMA, Endoderm: Amylase, Ektoderm: β 3T, NF) nachgewiesen werden.

Durch eine quantitative Erfassung des prozentualen Anteils positiver Zellen der 2D im Vergleich zur 3D Kultivierung, konnte eine induzierte neuronale Differenzierung der SGSCs in OBs dokumentiert werden (Abb. 27d). Dabei zeigte sich nicht nur ein Anstieg der β 3T exprimierenden Zellen um fast 50 %, sondern auch der prozentuale Anteil der NF exprimierenden Zellen stieg um ca. 20 % während der 3D Kultivierung. Die Anzahl der Nestin-positiven Zellen in den OBs stieg ebenfalls etwas an, dagegen sank die Anzahl von K7 positiven Zellen um ca. 20 %. Die Anzahl der K19 und α SMA exprimierenden Zellen schwankte sehr stark bei den SGSCs in 2D und den SGSCs in OBs. Eine induzierte ektodermale Differenzierung der SGSCs mittels einer 3D organotypischen Zellkultivierung konnte sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene verifiziert werden.

3.4.2.2 Induzierte Mesoderm differenzierung der SGSCs im Vergleich zu den BMSCs

Um das mesodermale Differenzierungspotential der SGSCs in adipogene, chondrogene und osteogene Zelltypen untersuchen zu können wurde eine induzierte Differenzierung über spezielle Medienzusätze durchgeführt. Für BMSCs konnte eine mesodermale Differenzierung mithilfe von Differenzierungsmedien schon gezeigt werden (Pittenger *et al.*, 1999). Deshalb wurden die BMSCs in diesem Versuch als Positivkontrolle verwendet.

Die gezielte Differenzierung in Fettzellen wurde bei den SGSCs und den BMSCs durch Medienzusätze über 7 und 21 Tage induziert. Zum Nachweis der Differenzierung wurden die Zellen mit dem Farbstoff Oil Red O behandelt (Abb. 28

Adipogen), dadurch färbten sich die Fetttropfen rot. Die Zellen in den Kontrollen wurden mit Kultivierungsmedium ohne die Zugabe von löslichen Faktoren kultiviert. Nach 7 Tagen waren bei den SGSCs nur sehr wenige Fetttropfen nachweisbar. Nur geringfügig mehr Fetttropfen konnten bei den BMSCs nach 7 Tagen nachgewiesen werden. Nach 21 Tagen zeigte sich bei den SGSCs keine Zunahme der Anzahl von Fetttropfen im Zytoplasma, somit konnte keine Differenzierung in Fettzellen induziert werden. Bei den BMSCs zeigte sich nach 21 Tagen eine deutliche Induktion von Fettzellen, durch die vermehrte Bildung von Fetttropfen im Zytoplasma. In den Kontrollen konnten keine Fetttropfen nachgewiesen werden.

Die gezielte Differenzierung in Knorpelzellen wurde bei den SGSCs und den BMSCs durch Medienzusätze und eine zusätzliche 3D Kultivierung, in sogenannten *micromass bodies* (MMBs), über 7 und 21 Tage induziert. Zum Nachweis der Differenzierung wurde eine Alcianblaufärbung verwendet (Abb. 28 Chondrogen). Nach einer Kultivierung von 7 Tagen unterschied sich die Struktur der MMBs sehr stark. Die MMBs der Kontrolle der SGSCs sowie der BMSCs mit und ohne Medienzusätze waren porös und weniger kompakt als die SGSCs mit Medienzusätzen kultivierten MMBs. Die Alcianblaufärbung zeigte nach 7 Tagen eine Färbung an den Rändern der MMBs der SGSCs und der BMSCs. Diese war bei den MMBs mit Medienzusätzen verstärkt, aber auch in den Kontrollen nachweisbar. Nach 21tägiger Kultivierung mit Medienzusätzen zeigte sich bei den MMBs der SGSCs und der BMSCs eine kompakte Struktur. Die Struktur der MMBs der Kontrollen blieb hingegen porös. Die Alcianblaufärbung zeigte sowohl bei den MMBs der SGSCs als auch der BMSCs mit Medienzusätzen eine deutliche Zunahme. Es konnte nicht nur eine Alcianblaufärbung in den Randbereichen sondern auch im Inneren der MMBs nachgewiesen werden. Bei den Kontrollen konnte keine Zunahme der Alcianblaufärbung nach 21tägiger Kultivierung detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass eine chondrogene Differenzierung bei den SGSCs als auch bei den BMSCs induziert wurde.

Die gezielte Differenzierung in Knochenzellen wurde bei den SGSCs und den BMSCs durch Medienzusätze über 7 und 21 Tage induziert. Zum Nachweis der Differenzierung wurde eine Färbung der alkalischen Phosphatase (AP) durchgeführt (Abb. 28 Osteogen). Nach 7 und 21 Tagen konnten bei den SGSCs sowohl in den Kontrollen als auch in den Kulturen mit Medienzusätzen vereinzelt positive Zellen nachgewiesen werden. Bei den BMCSs waren nach 7 und 21tägiger Kultivierung mit

Medienzusätzen nahezu alle Zellen positiv für AP. Die Zellen in den Kontrollen waren dagegen negativ. Es konnte gezeigt werden, dass eine osteogene Differenzierung bei den BMSCs aber nicht bei den SGSCs induziert werden konnte.

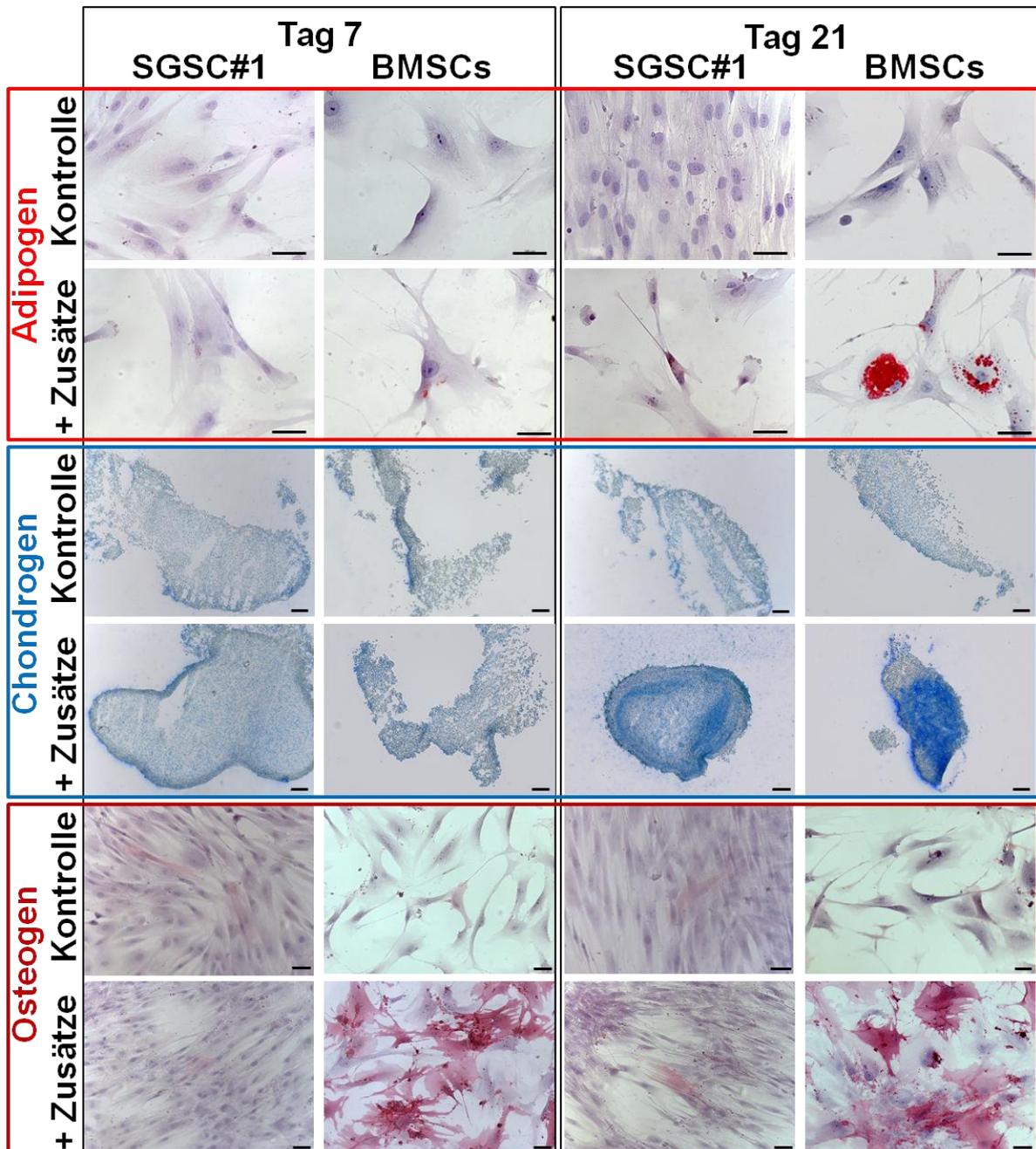


Abbildung 28: Induzierte Mesodermdifferentierung der SGSCs im Vergleich zu den BMSCs.

Adipogen: Eine gezielte Differenzierung in Fettzellen konnte über den Nachweis der Fetttropfen mithilfe einer Oil Red O Färbung für die BMSCs nach 21 Tagen, aber nicht für die SGSCs nachgewiesen werden. Die Kerne wurden mit Hämatoxilin gefärbt. Maßstab entspricht 100 µm.

Chondrogen: Eine gezielte Differenzierung in Knorpelzellen über den Nachweis einer Alcianblaufärbung konnte für die SGSCs und die BMSCs nach 21 Tagen verifiziert werden. Maßstab entspricht 200 µm.

Osteogen: Eine gezielte Differenzierung in Knochenzellen konnte über den Nachweis von alkalischer Phosphatase (AP) für die BMSCs nach schon 7 Tagen, aber nicht für die SGSCs nachgewiesen werden. Die Kerne wurden mit Hämatoxilin gefärbt. Maßstab entspricht 200 µm

3.5 SGSCs in der Hautwundheilung

Aufgrund der Lage der Schweißdrüsen in der leicht zugänglichen Achselhaut und der bevorzugten Differenzierung der SGSCs in Zellen des Ektoderms eignen sie sich besonders für mögliche Anwendungen der Hautregeneration. Neben dem entscheidenden, multipotenten Differenzierungspotential der SGSCs, ist auch die Sekretion von wundheilungsfördernden Zytokinen für eine verbesserte Wundheilung von enormer Bedeutung. Deshalb wurde im Folgenden das Zytokinsekretionsprofil der SGSCs mithilfe eines Membran-basierten Arraysystems untersucht.

Ein weiteres Problem einer gestörten Wundheilung oder einer sehr tiefen Verletzung der Haut, ist ein fibröser Verschluss der Wunde ohne eine funktionelle Wiederherstellung der Hautanhangsgebilde. Um die Funktionalität der Haut wiederherzustellen zu können wäre ein Einsatz der multipotenten SGSCs zur Regeneration der Schweißdrüsen denkbar. Einen anderen Ansatz stellt die Kultivierung der isolierten Schweißdrüsen in einem vorhandenen Hautersatzmaterial dar. Zur Untersuchung ob Schweißdrüsen *in vitro* kultivierbar sind, wurden diese nach der Isolation in eine Kollagenmatrix transplantiert und über 15 Tage kultiviert.

3.5.1 Zytokinsekretionsprofil

Bei dem Einsatz von adulten Stammzellen für die Wundregeneration ist die Sekretion wundheilungsfördernder Zytokine von entscheidender Bedeutung für die Kommunikation mit Zellen des umliegenden Gewebes. Das Zytokinsekretionsprofil der SGSCs wurde mithilfe eines Membran-basierten Arraysystems ermittelt, welches sezernierte Proteine aus dem Zellkulturüberstand bindet und detektierbar macht. Verwendet wurden für diesen Versuch Überstände einer 2D Kultur auf Zellkulturplastik nach einer 24 h Inkubation. Das Zytokinarray wies die folgenden Faktoren nach; *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), *serine proteinase inhibitor E1* (Serpine E1), *growth-related oncogene α* (GRO α), Interleukin 6 und 8 (Abb. 29a). Die relative Zytokinexpression wurde an der Intensität der Kontrollspots berechnet (Kapitel 2.2.4.4). Serpine E1 wurde mit 64 % am stärksten von den SGSCs exprimiert (Abb. 29b). IL 8, GRO α , IL 6 und MCP-1 konnten mit einer relativen Zytokinexpression zwischen 5-14 % nachgewiesen werden. Die SGSCs waren somit in der Lage Faktoren zu sezernieren, welche während der Wundheilung immunmodulatorische als auch angiogenetische Eigenschaften haben und bei dem Gewebeumbau eine Rolle spielen.

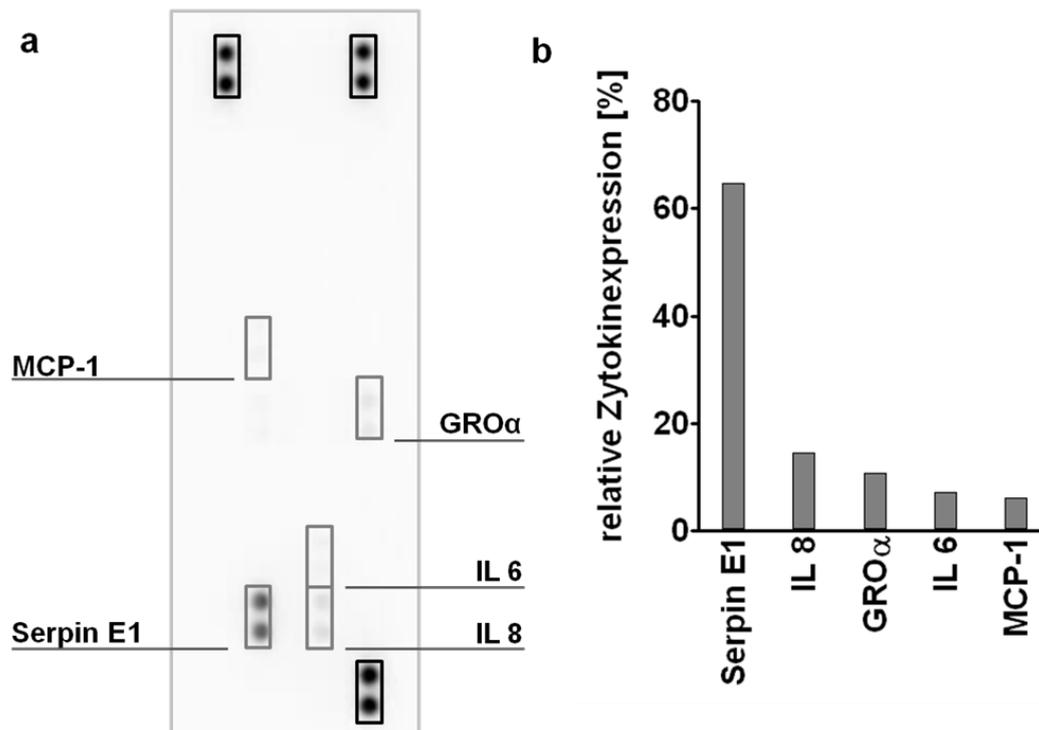


Abbildung 29: Zytokinsekretionsprofil der SGSCs. a) Das Zytokinarray wies die folgenden Faktoren nach; MCP-1, Serpin E1, GRO α , IL 6 und 8 (grau umrandet). Schwarz umrandet sind die Kontrollspots. b) Die relative Zytokinexpression wurde anhand der Intensität der Kontrollspots berechnet. Serpin E1 wurde mit 64 % am stärksten exprimiert. IL 8, GRO α , IL 6 und MCP-1 konnten mit einer relativen Zytokinexpression zwischen 5-14 % nachgewiesen werden.

3.5.2 Schweißdrüsenkultivierung in 3D Kollagenmatrix

Neben der Kultivierung und Charakterisierung der SGSCs für einen möglichen Einsatz in der Wundheilung, wurde versucht die frisch isolierten Schweißdrüsen in eine Kollagenmatrix (Optimaix) zu transplantieren und über einen längeren Zeitraum *in vitro* zu kultivieren. Die Analyse der transplantierten Schweißdrüsen in der Kollagenmatrix erfolgte nach 9 und 15 Tagen. Zum einen wurden die Zellen der Schweißdrüsen mithilfe eines MTT-Tests auf ihre Aktivität untersucht (Abb. 30a,b). Dabei zeigte sich nicht nur eine anhaltende Aktivität der Zellen nach der Transplantation, sondern zudem eine Aktivitätssteigerung über die Zeit (Abb. 30b). Besonders aktiv zeigte sich die apokrine Schweißdrüse, welche aber schon durch ihre Größe mehr Zellen gegenüber der ekkrinen Schweißdrüse besitzt. Zudem konnte bei den Schweißdrüsen eine zackenförmige Vergrößerung des aktiven (MTT-positiven) Bereiches verzeichnet werden. Diese Ausweitung ist wahrscheinlich in Zellmigrationen und/oder Zellteilungen begründet. Zum anderen wurden die transplantierten Schweißdrüsen nach 15 Tagen immunzytochemisch auf ihre Proteinexpression untersucht.

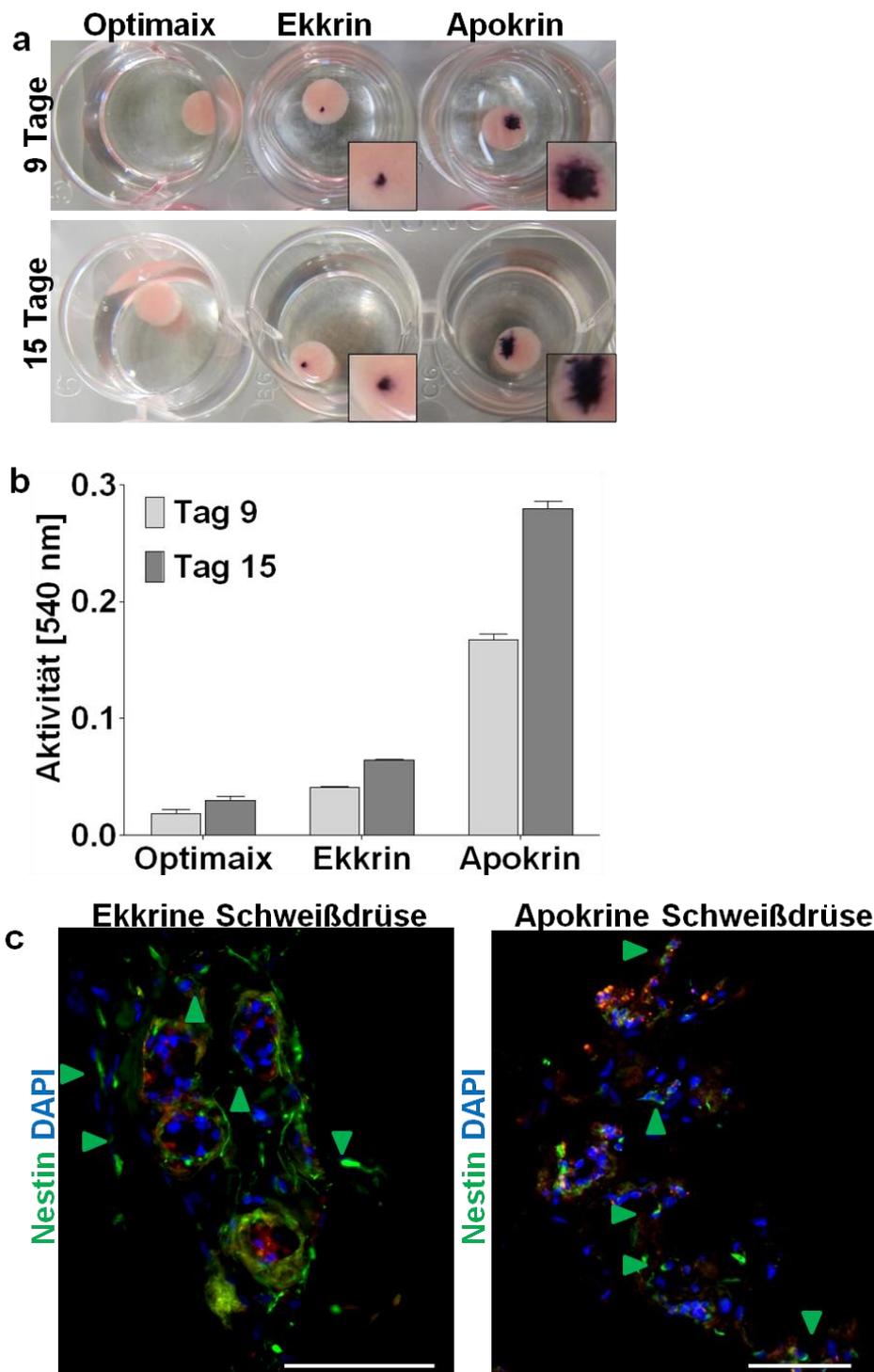


Abbildung 30: Schweißdrüsenkultivierung in 3D Kollagenmatrix. a) Aktivitätsuntersuchung mithilfe des MTT-Tests. Nach 9 Tagen konnten noch immer aktive Zellen der Schweißdrüsen in der Kollagenmatrix (Optimaix) nachgewiesen werden. Nach 15 Tagen konnte sowohl bei den ekkriren als auch den apokrinen Schweißdrüsen eine zackenförmige Vergrößerung des aktiven (MTT-positiven) Bereiches nachgewiesen werden. b) Quantitative Auswertung des MTT-Tests. Sowohl die ekkriren als auch die apokrinen Schweißdrüsenzellen waren nach 9 Tagen noch immer aktiv. Nach Tag 15 stieg die Aktivität noch weiter an. n=2, SEM c) Immunzytochemische Untersuchung der transplantierten Schweißdrüsen in der Kollagenmatrix. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Morphologie als auch eine mögliche Sekretion der Schweißdrüsen nach 15 Tagen noch erhalten war. Des Weiteren konnten immer noch Nestin-positive Zellen im Mesenchym nachgewiesen werden (siehe grüne Pfeile). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 μ m

Wie in Abbildung 30c zu erkennen ist, war sowohl bei den ekkrinen und den apokrinen Schweißdrüsen die ursprüngliche *in situ* Morphologie nach 15 Tagen *in vitro* Kultivierung noch immer erhalten. Nicht nur die Morphologie sondern auch die Proteinexpression ähnelte noch immer der einer aktiven Schweißdrüse. So konnten weiterhin Nestin-positive Zellen im Mesenchym der Schweißdrüsen nachgewiesen werden (grüne Pfeile). Das Fluoreszenzsignal in den sezernierenden Bereichen der Schweißdrüsen könnte darauf hindeuten, dass diese Schweißdrüsen immer noch zur Sekretion fähig waren, da die Sekrete eine Eigenfluoreszenz zeigen.

Diese Untersuchung präsentierte das enorme Potential humaner Schweißdrüsen. Selbst nach einer Isolationsprozedur und einer *in vitro* Kultivierung demonstrierten die Schweißdrüsenzellen eine hohe Proliferationskapazität. Zusätzlich waren sie in der Lage ihre *in situ* Morphologie und eine mögliche Sekretion aufrechtzuerhalten.

4 Diskussion

4.1 Lokalisation Nestin-positiver Stammzellen im Mesenchym humaner Schweißdrüsen

Nestin als Marker für adulte Stammzellen ermöglichte die Detektion einer neuen, adulten Stammzellpopulation in humanen Schweißdrüsen. Das Ziel dieser Arbeit war, die Nestin-positiven Stammzellen aus der Haut *ex vivo* anzureichern. Bis dato konnte bei der Präparation von Vollhaut nur eine geringe Ausbeute von Nestin-positiven Zellen erreicht werden (Ernst *et al.*, 2010; Gingras *et al.*, 2007; Kruse *et al.*, 2006a). In humaner Haut sind Nestin-positive Zellen zusätzlich zu den Schweißdrüsen auch im Mesenchym der Haarfollikel und den Talgdrüsen zu finden (Tiede *et al.*, 2009). Die Isolation einer proliferierenden Nestin-positiven Stammzellpopulation aus humanen Schweißdrüsen konnte bisher nur von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Petschnik *et al.*, 2010). Die Gewinnung einer Nestin-positiven Stammzellpopulation, aus verschiedenen Anteilen des Haarfollikels mit multipotenten Differenzierungseigenschaften, konnte dagegen schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Amoh and Hoffman, 2010; Amoh *et al.*, 2009b; Amoh *et al.*, 2005; Biernaskie *et al.*, 2009; Hoffman, 2006; Li *et al.*, 2003; Sieber-Blum *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006). Der Anteil der Nestin-positiven Zellen an der Gesamtpopulation war jedoch eher gering oder die Angaben fehlten gänzlich. Zudem ist die Expression von Nestin in der Wulstregion humaner Haarfollikel nicht ganz eindeutig. So konnten Amoh und Kollegen Nestin in der humanen Wulstregion nachweisen, Kloepper und Kollegen dagegen nicht (Amoh *et al.*, 2012; Kloepper *et al.*, 2008). Des Weiteren existiert noch keine einheitliche und zuverlässige Methode zur Isolation und Expansion von Nestin-positiven Zellen aus dem humanen Haarfollikel.

Inwieweit sich die Nestin-positiven Stammzellpopulationen unterschiedlicher Hautkompartimente gleichen, kann nur vermutet werden. Es ist möglich, dass funktionelle Parallelen zwischen den Nestin-positiven Zellpopulationen der Hautanhangsgebilde existieren. Eine mögliche Erklärung für diese Theorie ist der Ursprung aller Hautanhangsgebilde aus der Hautleiste während der Embryonalentwicklung (Cowin and Wysolmerski, 2010; Ersch and Stallmach, 1999; Holbrook and Minami, 1991; Moll and Moll, 1992). Es kann vermutet werden, dass der entscheidende epitheliale-mesenchymale Signalaustausch von Nestin-positiven

Zellen im Mesenchym reguliert wird. Diese epitheliale-mesenchymale Interaktion ist nicht nur während der Embryonalentwicklung sondern auch während des Haarzykluses, der Aktivierung in der Pubertät (apokrine Schweißdrüsen) oder in der Schwangerschaft (Milchdrüsen) von entscheidender Bedeutung. Fakt ist, dass die Hautanhangsgebilde morphologische und physiologische Veränderungen während ihrer Lebenszeit durchlaufen, welche einer exakten Regulation unterliegen. Bei den exokrinen Drüsen der Haut kommt hinzu, dass sie während ihrer Sekretion Zellen verlieren, welche stetig von Vorläuferzellen ersetzt werden müssen (Bargmann, 1977; Bennighoff, 1985; Blanpain and Fuchs, 2009; Fuchs and Horsley, 2008; Lu *et al.*, 2012; Watt *et al.*, 2006; Woodward *et al.*, 2005). In allen drei exokrinen Drüsen der Haut konnten Nestin-positive Zellen nachgewiesen werden (Kolar *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Tiede *et al.*, 2009). Somit könnten Nestin-positive Zellen einerseits als Regulatoren für den epithelialen-mesenchymalen Signalaustausch fungieren, andererseits könnten sie Vorläuferzellen für die Homöostase als auch für die Regeneration darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine genaue Lokalisation der Schweißdrüsen und deren Unterscheidung in ekkrine und apokrine Typen in histologischen Gewebeschnitten realisiert werden. Ermöglicht wurde dies durch die Auswahl geeigneter Antikörper in immunzytochemischen Analysen von Achselhaut. Die Schweißdrüsen ließen sich *in situ* anhand ihrer unterschiedlichen Expression von CEA (Li *et al.*, 2009; Metze *et al.*, 1996) und Mucin (Ando *et al.*, 1998) unterscheiden. CEA und Mucin sind Glykoproteine und werden in gesunder Haut nur in den Schweißdrüsen exprimiert. Die Nestin-positiven Stammzellen konnten sowohl im direkt angrenzenden Mesenchym der ekkrinen als auch der apokrinen Schweißdrüsen lokalisiert werden. Aufgrund dessen wurden zur Gewinnung der Nestin-positiven Stammzellpopulation sowohl ekkrine als auch apokrine Schweißdrüsen verwendet.

4.2 Etablierung des Isolationsverfahrens humaner Schweißdrüsen und *in vitro* Expansion der SGSCs

Eine Optimierung der Isolationsmethode der Schweißdrüsen wurde durchgeführt um die Methode zu vereinfachen, die manuellen Arbeiten zu minimieren und die Schweißdrüsenausbeute und damit die initiale Zellmenge zu erhöhen.

Durch eine vergleichende Isolation der SGSCs aus verschiedenen humanen Hautarealen konnte ermittelt werden, dass eine Achselhautbiopsie das optimale Isolationsgewebe darstellt. Achselhaut ist leicht zugänglich, hat eine sehr große Schweißdrüsendichte und zeigt hervorragende Heilungseigenschaften nach der Biopsieentnahme.

Zu Beginn der Isolation wurde die Epidermis durch Verwendung von Dispase von der Dermis abgelöst. Durch die Entfernung der Epidermis konnte die mechanische Zerkleinerung der Dermis entscheidend vereinfacht werden. Des Weiteren konnten durch die Entfernung falsch positive Neutralrot Reaktionen der Epidermis vermieden werden. Die Isolation wurde dann mit der Dermis fortgesetzt. Die Dermis wurde mechanisch zerkleinert und mithilfe einer verlängerten Inkubation in Kollagenasehaltigem Digestionsmedium konnte die Ausbeute bindegewebsfreier Schweißdrüsen entscheidend vergrößert werden. Die isolierten Schweißdrüsen ließen sich zudem leichter am Kollagen Typ IV-beschichteten Zellkulturboden immobilisieren und es zeigte sich ein schnelleres Auswachsen der Zellen aus den Schweißdrüsen.

Die Optimierung des Isolationsprotokolls der Schweißdrüsen aus der Achselhaut resultierte somit in einer Zellpopulation, welche in kurzer Zeit mit der größtmöglichen Zellausbeute und den besten Proliferationseigenschaften gewonnen werden konnten. Im Hinblick auf eine Automatisierung des Isolationsprozesses wurden die manuellen Arbeiten auf ein Minimum reduziert. Weiterführende Optimierungen zur Anpassung des Isolationsverfahrens an *good manufacturing practice*- GMP Richtlinien wurden von Moritz Göldner in seiner Diplomarbeit durchgeführt (Göldner, 2012). Hierbei sollten möglichst alle mechanischen Aufarbeitungsschritte durch eine Automatisierung ersetzt werden. Des Weiteren wurde versucht das Isolationsprotokoll auf GMP konforme Reagenzien umzustellen. Nach der Isolation sollten die SGSCs in einem geschlossenen System, sogenannten Zellkulturbeuteln, vermehrt werden. Die ersten Ergebnisse dieser Untersuchungen sind vielversprechend und werden zurzeit in weiteren Versuchen verifiziert.

Zur Anreicherung der Nestin-positiven Zellen nach der Isolation konnte aufgrund des intrazellulär vorliegenden Nestins keine vitale Vorsortierung der Zellen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) durchgeführt werden. Daher wurde versucht die Nestin-positiven Stammzellen durch Auswachsen auf beschichteten Zellkulturschalen anzureichern. Durch eine lückenlose Verfolgung der Zellen während des Auswachsens aus den Schweißdrüsen, mittels Zeitraffermikroskopie, konnte die Entstehung einer adhärent migrierenden und proliferativen Zellpopulation verfolgt werden. Eine Untersuchung der Nestin Expression zeigte, dass 90 % der ausgewachsenen Zellen Nestin exprimierten. Da die Nestin-positiven Zellen *in situ* nicht markiert wurden, konnte der Ursprung der Zellen mithilfe der Zeitraffermikroskopie nicht genauer bestimmt werden. Da Nestin-positive Zellen aber in der Peripherie der isolierten Schweißdrüsen detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass diese zur entstandenen Zellpopulation beigetragen haben. Die Verfolgung des Auswachsens Nestin-positiver Zellen aus dem Haarfollikel konnte von Amoh und Hoffman mithilfe von transgenen Mäusen, in denen das *green fluorescence protein* (GFP) an Nestin gekoppelt wurde, beobachtet werden (Amoh and Hoffman, 2010). Trotzdem bleibt unklar, ob ausschließlich Nestin-positive Zellen zur resultierenden Stammzellpopulation beigetragen haben oder andere Zelltypen *in vitro* ebenfalls begonnen haben Nestin zu exprimieren.

Um die Veränderungen der Zellen von *in situ* zu *in vitro* untersuchen zu können, wurden frisch isolierte Schweißdrüsen und die SGSCs in der Passage 0 auf ihre Genexpression untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression der Schweißdrüsen-assoziierten Transkripte wie K77, CEA und Mucin während der *in vitro* Kultivierung abnahmen. K77, welches *in situ* ausschließlich in luminalen Zellen der ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert wird (Langbein *et al.*, 2005), konnte in der Passage 0 noch nachgewiesen werden. In späteren Passagen konnte es aber nicht mehr detektiert werden. Das könnte einerseits bedeuten, dass die differenzierten Zellen während der *in vitro* Kultivierung, vielleicht durch eine fehlende adhärente Proliferationsfähigkeit, verloren gegangen sind. Andererseits könnte die Veränderung des Expressionsprofils einen Wandel der Zellidentität oder eine teilweise Reprogrammierung bedeuten. So könnten die differenzierten Zellen während der *in vitro* Kultivierung die Expression Schweißdrüsen-assoziiierter Transkripte eingestellt haben und gleichzeitig mit der Synthese Stammzell-assoziiierter Transkripte begonnen haben. Ein ähnlicher Prozess konnte von Rapoport und Kollegen bei

pankreatischen Zellen beobachtet werden. Diese stellten während der *in vitro* Kultivierung ihre Amylaseexpression ein und begannen Nestin zu exprimieren (Rapoport *et al.*, 2009).

Die relative Genexpression von Nestin variierte, von den Schweißdrüsen zu den SGSCs in Passage 0, zwischen einer Abnahme und einem geringen Anstieg, obwohl fast jede ausgewachsene Zelle Nestin auf Proteinebene exprimierte. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Zellen zum Zeitpunkt des Erntens im konfluenten Stadium waren. Zu diesem Zeitpunkt ist die Transkriptionsrate sehr gering, während das Protein sehr hoch exprimiert wird.

Nach dem Auswachsen der Nestin-positiven Zellen aus den Schweißdrüsen, zeigten diese eine kontinuierliche Proliferation. Bei der Wachstumsanalyse der SGSC#1 über 14 Tage zeigte sich ein besonderes Wachstumsverhalten. Dieses war gekennzeichnet von einer Stagnation der Proliferation nach dem Erreichen der Konfluenz und einem Wiedereinsetzen der Proliferation nach einer morphologischen Veränderung. Dieses Verhalten konnte bei den SGSC#3 und #5, welche nach dem optimierten Protokoll isoliert wurden, nur in einer sehr schwachen Ausprägung beobachtet werden. Vermutlich sind die Stammzellpopulationen, welche nach dem bisherigen Protokoll isoliert wurden, etwas heterogener in ihrer Zusammensetzung. Die vorhandenen Subpopulationen aus Stammzellen und differenzierten Zellen haben dabei unterschiedliche Phänotypen und Proliferationseigenschaften. Während die Stammzellen klein und spindelförmig sind und sich schnell teilen, sind die differenzierten Zellen größer, ausgebreitet und teilen sich selten oder gar nicht. Die Korrelation zwischen Zellgröße und Proliferationsvermögen konnte sowohl bei Fibroblasten als auch Keratinozyten beobachtet werden (Angello *et al.*, 1987; Barrandon and Green, 1985). Die Stagnation im Wachstumsverhalten und die anschließende morphologische Veränderung der SGSC#1 könnte damit erklärt werden, dass während der Stagnation der Proliferation die differenzierten Zellen abstarben oder von den kleineren, potenteren Stammzellen verdrängt wurden. Da die Plateauphase von den SGSC#1 nach 14 Tagen nicht erreicht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zellen weiter proliferieren und übereinander wachsen würden. Eine fehlende Kontaktinhibition könnte auf eine Entartung der Zellen hindeuten. Was dieses spezielle Wachstumsverhalten bei den SGSC#1 ausgelöst hat, konnte an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Da dieses Verhalten

aber nur bei den SGSC#1 beobachtet wurde, kann man nicht von einer generell fehlenden Kontaktinhibition der SGSCs ausgehen. Die schwache Ausprägung der Stagnation der Proliferation und das Erreichen der Plateauphase der SGSC#3 und #5 könnte darauf hindeuten, dass es sich um homogenere Zellpopulationen handelt. Obwohl beide eine geringere Zellzahl nach 14 Tagen aufwiesen, zeigten sie eine identische Populationsverdopplung von 2,9 Tagen in der exponentiellen Wachstumsphase und präsentierten eine höhere Aktivität im Vergleich zu den SGSC#1. Somit stellten die nach dem optimierten Protokoll isolierten SGSCs eine homogenere Zellpopulation dar, welche zudem eine höhere Aktivität aufwies.

In einer Langzeitkultur war die Expansion der SGSCs *in vitro* bis Passage 13 und darüber hinaus ohne Einschränkung der Proliferationsfähigkeit möglich. Obwohl die SGSC#5 eine größere initiale Zellmenge aufwiesen, zeigten sich bei der Langzeitkultivierung ähnliche Proliferationseigenschaften im Vergleich zu den SGSC#1. Schlussfolgernd ist festzustellen, dass die optimierte Isolationsmethode zur Gewinnung einer homogenen Zellpopulation mit einer hohen Proliferationskapazität und Aktivität beigetragen hat.

4.3 Spontanes, multipotentes Differenzierungspotential der SGSCs *in vitro*

Die Stammzeleigenschaften der SGSCs wurden durch den Nachweis von Transkripten und Proteinen, welche mit Multipotenz und Plastizität assoziiert sind gezeigt. Dazu gehörten die TF Nanog, Oct4, SOX2, KLF4 und Nucleostemin, welche in einer kombinierten Expression bisher nur bei embryonalen Stammzellen (ESCs) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) beobachtet wurden (Chan *et al.*, 2009; Fong *et al.*, 2008; Hyslop *et al.*, 2005; Reubinoff *et al.*, 2000; Scholer *et al.*, 1990; Zaehres *et al.*, 2010). Erst kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass Oct4 und SOX2 auch einen Einfluss auf die Differenzierung von ESCs haben (Thomson *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Ratajczak postulierte hingegen die Hypothese, dass pluripotente Stammzellen nach der Embryonalentwicklung im Organismus verbleiben, aber durch verschiedene Mechanismen, wie durch eine nicht-physiologische Nische, Inhibitoren, fehlende Stimuli oder Methylierungen, in einem Ruhezustand verbleiben. Die Pluripotenz kann sich aber durch die Aufhebung der inhibierenden Faktoren wieder einstellen (Ratajczak *et al.*, 2007). Mit dieser Hypothese könnte auch erklärt werden warum *in vitro* verschiedenste adulte

Stammzellpopulationen beginnen wieder Pluripotenzmarker zu exprimieren (Ji *et al.*, 2008; Pochampally *et al.*, 2004; Tai *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2006). Trotzdem scheint sich die Expression der Stammzellmarker zwischen den ESCs und den adulten Stammzellen zu unterscheiden. Jiang und Kollegen konnten nachweisen, dass die Genexpression von Oct4 in ESCs 1000-mal stärker ist als die in den adulten Stammzellen (Ji *et al.*, 2008). Eine ähnliche Tendenz konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Die Stammzellmarker Oct4, SOX2 und Nanog gehörten zu den Transkripten mit der geringsten Genexpression der SGSCs. Eine Genexpression von Oct4 und Nanog in Stammzellpopulationen exokriner Drüsengewebe konnte auch schon von Gorjup und Kollegen nachgewiesen werden (Gorjup *et al.*, 2009). Der Proteinnachweis von Oct4, SOX2 und Nanog zeigte eine geringe Intensität und ein anderes Färbemuster im Vergleich zu den ESCs. Während die Expression der Stammzellmarker in den ESCs im gesamten Kern detektiert werden kann (Rodin *et al.*, 2010), war diese in den SGSCs punktförmig im Kern lokalisiert. Dieses Färbemuster wurde auch schon in anderen Publikationen beschrieben (Tai *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006). Bei dem Nachweis der aktivierten TF der SGSCs mithilfe des TF-Chips, konnte das aktivierte Oct4 nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigte zudem die Unterschiede in der Expression zu den ESCs, in denen das aktivierte Oct4 vorliegt. Somit konnte eine Oct4 Expression auf Gen- und Proteinebene in den SGSCs detektiert werden. Dieses lag aber wahrscheinlich nicht in seiner aktivierten Form vor.

Die Stammzelleigenschaften der SGSCs konnten, neben der Expression von Stammzellmarkern, durch ein keimblattübergreifendes spontanes Differenzierungspotential verifiziert werden. Zelltyp-spezifische Proteine für Zellen endodermalen, mesodermalen und ektodermalen Ursprungs konnten in einzelnen Zellen der SGSCs nachgewiesen und durch dessen Genexpression bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass die Genexpression der SGSCs über die Passagen 8-21 keine signifikanten Unterschiede aufwies. Dies belegt, dass es sich bei den SGSCs um eine stabile Stammzellpopulation handelt. Das spontane Differenzierungspotential der SGSCs konnte zudem durch den Nachweis von aktivierten TF der mesodermalen Differenzierung verifiziert werden. Die hier untersuchten aktivierten TF für eine endodermale Differenzierung konnten nicht nachgewiesen werden. Neben dem spontanen multipotenten Differenzierungspotential konnte die Stammzellartigkeit der SGSCs durch die

Generierung von Zellklonen belegt werden. Über eine Verdünnung der Zellsuspension wurden Einzelzellen in Kultur genommen und in ihrer Proliferation verfolgt. So konnten drei Zellklone aus jeweils Einzelzellen generiert werden. Diese proliferierten, exprimierten Nestin und zeigten zudem ein Genexpressionsprofil wie die initiale Stammzellpopulation.

4.4 Abgrenzung der SGSCs zu Haut-abgeleiteten Zellpopulationen und bereits etablierten Stammzelllinien

Die Charakterisierung der SGSCs verifizierte die besonderen Eigenschaften dieser Stammzellpopulation und dokumentierte dabei wesentliche Unterschiede zu anderen Zellpopulationen. Für eine Abgrenzung der SGSCs zu Haut-abgeleiteten Zellpopulationen und bereits etablierten Stammzelllinien wurde deren spontane und induzierte Differenzierung gegenübergestellt.

Im Vergleich der spontanen Nestin Expression der SGSCs mit den EpiSCs, den BMSCs und den dermalen Fibroblasten *in vitro* zeigte sich, dass außer den SGSCs keine der anderen Zellpopulationen Nestin in hohem Maße exprimierte. Somit ist eine starke Nestin Expression ein entscheidendes Charakteristikum der SGSCs. Ein möglicher Einfluss der verwendeten Medien der unterschiedlichen Zellpopulationen auf die Nestin Expression kann aber nicht ausgeschlossen werden und sollte in weiteren Versuchen näher untersucht werden.

Die möglichen Auswirkungen einer hohen Nestin Expression auf eine Stammzellpopulation werden im Folgenden erläutert. Nestin wurde zunächst als neuraler Stammzellmarker identifiziert (Dahlstrand *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010; Yaworsky and Kappen, 1999). Da Nestin allerdings auch in anderen adulten Progenitor- und Stammzellpopulationen detektiert werden konnte (Amoh *et al.*, 2009c; Hoffman, 2007; Mokry *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2010; Toma *et al.*, 2005; Wiese *et al.*, 2004), wurde seine Expression als genereller Marker für adulte Stammzellen anerkannt.

Bei der Untersuchung des Nestingens wurden verschiedene regulatorische Bereiche identifiziert, welche nicht ausschließlich bei der Entwicklung neuraler Zellen eine Rolle spielen. Die neuralspezifische Expression von Nestin wird vom 2. Intron reguliert, dagegen wird die myogene und endotheliale Expression vom 1. Intron kontrolliert (Aihara *et al.*, 2004; Yaworsky and Kappen, 1999; Zimmerman *et al.*,

1994). Nestin wird während der Entwicklung von Vorläuferzellen exprimiert und bei der Ausdifferenzierung der Zellen durch andere gewebespezifische Intermediärfilamente wie *glial fibrillary acidic protein* in Astrozyten, NF in Neuronen, Desmin in Muskelgewebe und Vimentin in Endothel ersetzt. Interessanterweise wird die Nestin Expression auch während regenerativer Prozesse in adulten Organismen wieder induziert (Calderone, 2012; Frisen *et al.*, 1995; Mokry *et al.*, 2004; Uchugonova *et al.*, 2011; Vaittinen *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt, dass eine Nestin Expression mit einer dynamischen Zellpopulation assoziiert ist, welche sich schnell teilt und migriert (Sahlgren *et al.*, 2001). Als Intermediärfilament besteht Nestin aus einem zentralen Abschnitt mit α -helikaler Struktur. An diese Abschnitte schließen sich nicht-helikale Endstücke an. Während der zentrale Abschnitt große Homologien aufweist, sind die nicht-helikalen Endstücke variabel. Der N-Terminus ist dabei für die Filamentbildung verantwortlich, während der C-Terminus höchstwahrscheinlich gewebespezifisch ist (Chang and Goldman, 2004). Der C-Terminus ist bei Nestin, im Vergleich zu den anderen Intermediärfilamenten, sehr lang (Chang and Goldman, 2004). Er ragt aus dem Filament heraus und steht somit für eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Bindungspartnern zur Verfügung (Chou *et al.*, 2003; Herrmann and Aebi, 1998). Nestin kann Homodimere und Homotetramere bilden, ist aber nicht in der Lage eigenständig Filamente zu formen, da der dafür erforderliche N-Terminus von Nestin zu kurz ist (Chang and Goldman, 2004). Nestin bindet daher zur Filamentbildung an Typ III Intermediärfilamente wie Vimentin (Eliasson *et al.*, 1999; Steinert *et al.*, 1999). Während der Mitose wird Nestin im Filamentkomplex mit Vimentin phosphoryliert. Dies führt zu einer Konformationsänderung und destabilisiert den Filamentkomplex was einen beschleunigten Abbau bedingt (Chou *et al.*, 2003; Sahlgren *et al.*, 2001). Dieser dynamische Auf- und Abbau, mit einem Fließgleichgewicht zwischen gelösten, oligomeren Untereinheiten im Zytoplasma und polymerisierten, unlöslichen Filamenten ist nicht nur für die Mitose entscheidend, sondern auch für die Prozesse der Motilität und Adhäsion (Chou *et al.*, 2003).

Somit gewährleistet Nestin als Intermediärfilament nicht nur die mechanische Integrität der Zelle, sondern spielt zudem eine Rolle bei der Motilität als auch der Zellzykluskontrolle und der Signaltransduktion (Chang and Goldman, 2004). Eine hohe Nestin Expression kennzeichnet besonders potente Zellen, welche eine Vielzahl von zellbiologischen Prozessen regulieren können.

4.4.1 Verstärkte ektoдерmale Differenzierung der SGSCs

Neben der prominenten Nestin Expression konnte bei den SGSCs eine spontane Expression epithelialer Gene nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine besonders stabile Expression von K7, K15, Col7 α und Nidogen.

Aufgrund des möglichen Einsatzes der SGSCs zur zellbasierten Wundheilungstherapie und des nicht exakt zu bestimmenden Ursprungs der SGSCs aus den humanen Schweißdrüsen, wurde zur eindeutigen Unterscheidung zu den EpiSCs eine vergleichende Proteinanalyse durchgeführt. EpiSCs stellen eine besonders potente Subpopulation der Keratinozyten dar und können durch ihre spezielle Proteinexpression von z.B. Integrin β 1, I α 6, p63 und ihre geringe Zellgröße identifiziert werden (Barthel and Aberdam, 2005; Kaur and Li, 2000; Li *et al.*, 2008; Ruetze *et al.*, 2010). Des Weiteren ist eine Abgrenzung der SGSCs gegenüber speziellen Keratinozytensubpopulationen von entscheidender Bedeutung, seit Biedermann und Kollegen die Isolation von Keratinozyten-Vorläufern aus ekkrinen Schweißdrüsen zeigen konnten (Biedermann *et al.*, 2010). Zudem wurde die Existenz potentieller epidermaler Vorläuferzellen in Schweißdrüsen auch schon von anderen Arbeitsgruppen postuliert (Barrandon, 2007; Brouard and Barrandon, 2003). Besonderes Interesse galt zudem der Proteinexpression in den Stammzellnischen der Schweißdrüsen, der Epidermis und der Haarfollikel. Dabei lag der Fokus auf der Expression von Keratinen. Diese werden ausschließlich von Zellen des Epithels exprimiert und gehören wie Nestin zu den Intermediärfilamenten (Moll *et al.*, 2008). Die spezifische Zusammensetzung der exprimierten Keratine ist kennzeichnend für das Differenzierungsstadium in dem sich die Epithelzellen befinden. Als Teil des epithelialen Zytoskeletts sind sie entscheidend für die mechanische Stabilität und Integrität der Epithelzellen und des ganzen Gewebes. Sie durchziehen das gesamte Zytoplasma der Zelle und binden an die typischen epithelialen Zell-Zell-Kontakte, die Desmosomen. Einige Keratine haben zudem regulatorische Funktionen und sind an intrazellulären Signalwegen, wie der Wundheilung und der Apoptose, beteiligt (Moll *et al.*, 2008).

Rein morphologisch unterschieden sich die SGSCs von den EpiSCs in der Zellgröße und der Zellform. Die EpiSCs waren im subkonfluenten Stadium überwiegend klein, rund, zytoplasmaarm und zeigten die typische kopfsteinpflasterartige Zellform im konfluenten Stadium. Dagegen waren die SGSCs spindelförmig und langgestreckt. Eine ähnliche Proteinexpression der SGSCs und der EpiSCs zeigten die Keratine 7

und 19. Welche häufig zusammen exprimiert werden. Beide Keratine können *in situ* in einschichtigem Epithel (Moll and Moll, 1992) und daher auch in luminalen Zellen der Schweißdrüsen nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2009) (Abb. 31, Tabelle 10). Während der Wundheilung kommt es zu einer Induktion dieser beiden Keratine (Moll *et al.*, 1991) und scheint mit einer Reduktion des Differenzierungsstadiums einherzugehen (Moll *et al.*, 2008). K19 wird zudem als Stammzellmarker *in vivo* und *in vitro* beschrieben (Larouche *et al.*, 2005). In der Epidermis ist die K19 Expression altersabhängig und wird im adulten Organismus nicht mehr exprimiert. Bei der Kultivierung von Keratinozyten ist der Anteil K19-positiver Zellen ein Marker für die Potenz zur Selbsterneuerung und ihrer regenerativen Kapazität (Pontiggia *et al.*, 2009). Im Haarfollikel wird K19 sowohl in der Wulstregion als auch von einigen Zellen der äußeren Haarwurzelscheide exprimiert (Gho *et al.*, 2004; Kloepper *et al.*, 2008).

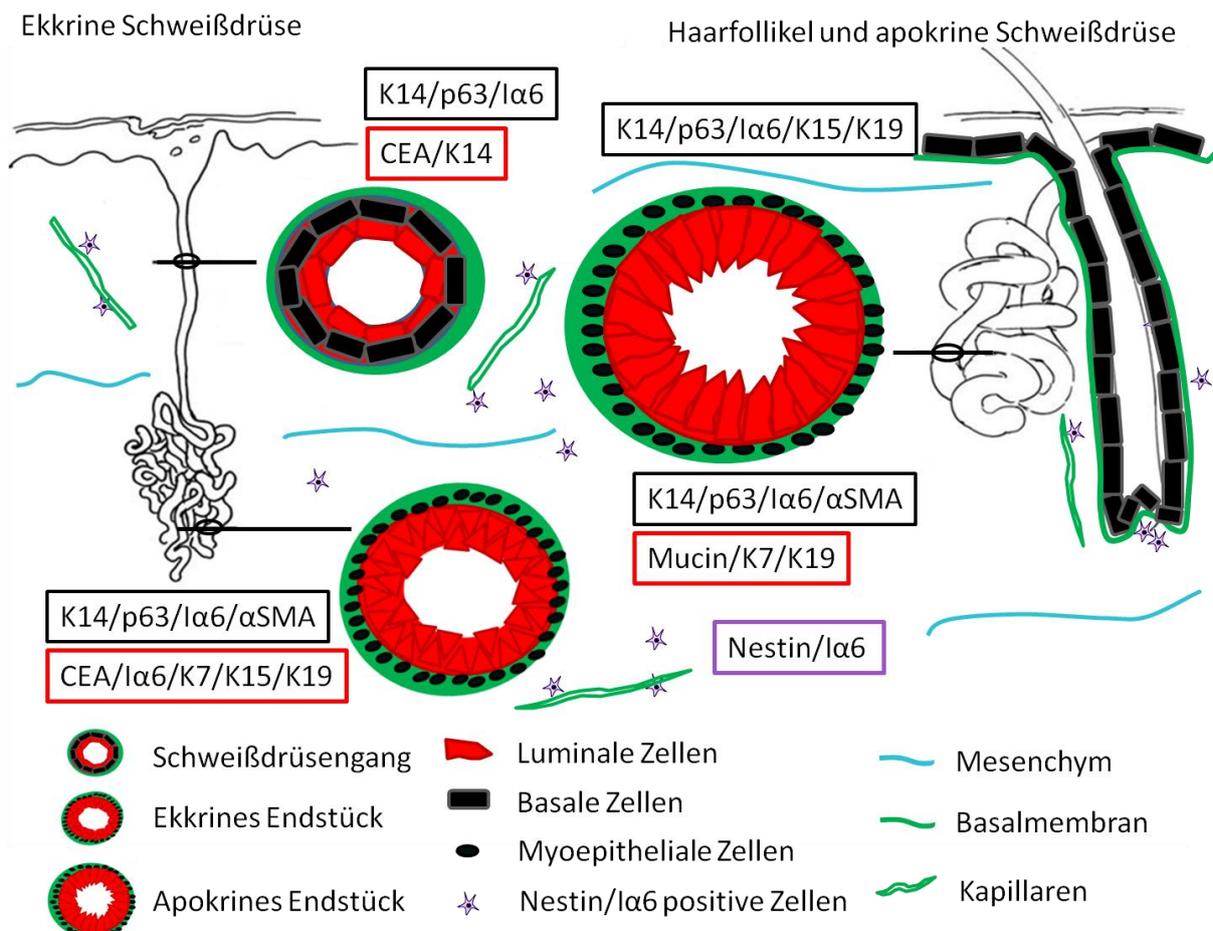


Abbildung 31: Expressionsschema der untersuchten Proteine in der Haut und ihren Anhangsgebilden. Dargestellt sind die ekrine Schweißdrüse und der Haarfollikel mit einer apokrinen Schweißdrüse. Die ausführenden und sezernierenden Kompartimente der Schweißdrüsen sind zusätzlich in einem Querschnitt abgebildet. Die exprimierten Proteine sind in Kästen der gleichen Farbe wie die exprimierenden Zellen an der jeweiligen Hautstruktur dargestellt. Siehe auch Tabelle 10. Veränderte Abbildung nach (Wilke *et al.*, 2006)

Die K19-positiven Zellen repräsentieren dabei eine Subpopulation der K15-positiven Zellen (Pontiggia *et al.*, 2009). K15 ist ebenfalls ein Stammzellmarker und wird basal in der Epidermis, im Haarfollikel als auch in ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert (Kloepper *et al.*, 2008; Pontiggia *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2000). Zusätzlich zu den Stammzellmarkern K19 und K15 konnte $\alpha 6$ sowohl in den SGSCs als auch den EpiSCs detektiert werden. Die EpiSCs exprimierten $\alpha 6$ konform an den Zell-Matrix-Kontakten, während $\alpha 6$ von den SGSCs auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert wurde. Dabei zeigten sich große Expressionsunterschiede zwischen den Zellen. Integrine spielen eine Rolle bei der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion, der Adhäsion, der Migration, der Proliferation und der Differenzierung (Hall *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2010). $\alpha 6$ gilt als Stammzellmarker und wird in ESCs (Meng *et al.*, 2010; Rodin *et al.*, 2010), in Basalzellen der Epidermis, in den Schweißdrüsen und im Haarfollikel exprimiert (Blanpain *et al.*, 2004; Kloepper *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass in den Schweißdrüsen nicht nur Nestin-positive und $\alpha 6$ -positive Zellen detektiert werden können, sondern dass diese Zellen überwiegend, aber nicht ausschließlich, Nestin und $\alpha 6$ koexprimierten (Abb. 32a). *In vitro* konnten ebenfalls doppelt positive Zellen für $\alpha 6$ und Nestin detektiert werden (Abb. 32b). Dabei zeigte sich, dass die $\alpha 6$ Expression sich aber nicht auf Nestin-positive Zellen beschränkte. Es konnte schon gezeigt werden, dass $\alpha 6$ einen Einfluss auf die Zellmotilität hat und damit die Wundheilung fördert (Bouvard *et al.*, 2010; Kligys *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2000). Zudem reguliert es Signale, welche das Zellüberleben steuern (Chung *et al.*, 2002). Dies zeigt welche fundamentale Bedeutung Integrine in der Signaltransduktion der Zellen haben und welche Rolle sie in der Regulation von Stammzellnischen spielen (Spradling *et al.*, 2001). Ein wichtiges Integrin ist $\alpha 6\beta 4$. Dieses ist Bestandteil der Hemidesmosomen und Rezeptor für Laminin. Es bindet aber auch andere extrazelluläre Matrixproteine (Watt, 2002). Hemidesmosomen binden wiederum an Intermediärfilamente. Somit stellt $\alpha 6$ nicht nur die Verbindung zu den Intermediärfilamenten her, sondern auch zu den Stammzellmarkern Oct4 und SOX2, welche direkt von $\alpha 6$ reguliert werden (Yu *et al.*, 2012). $\alpha 6$ konnte zudem im Endothel als auch in peripheren Nerven detektiert werden (Bouvard *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2006).

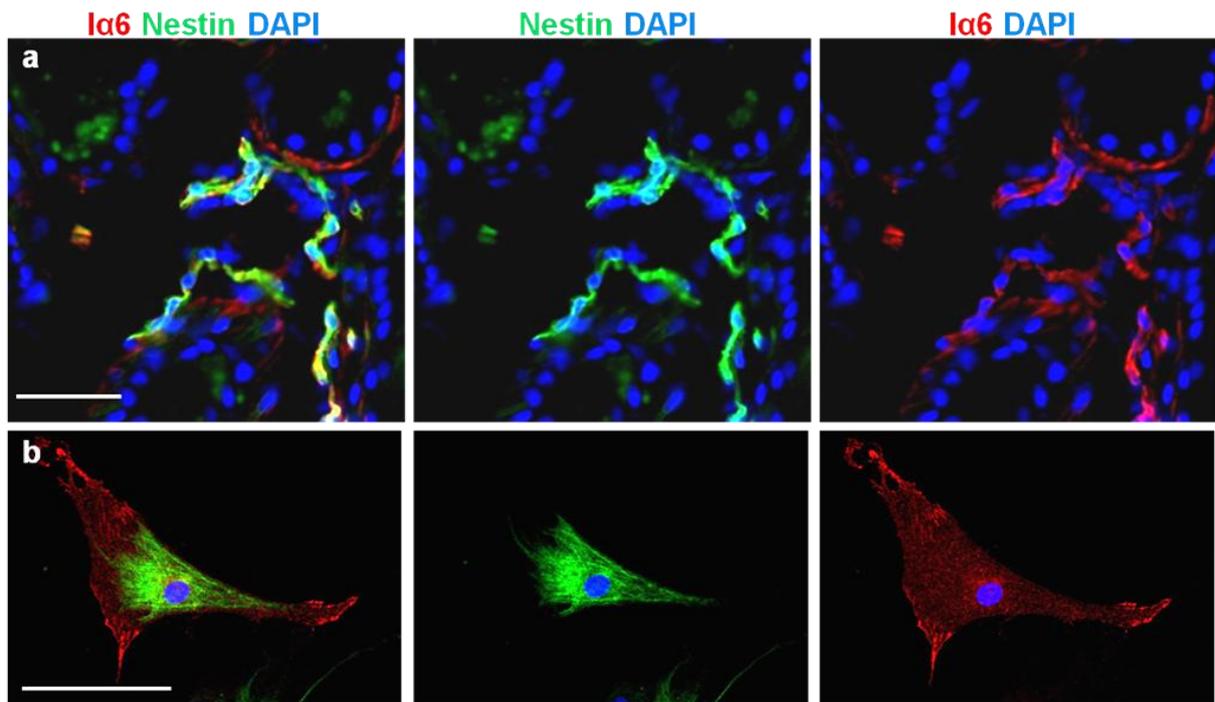


Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung von Iα6 und Nestin *in situ* und *in vitro*. a) Iα6 (rot) und Nestin (grün) doppelt positive Zellen im Mesenchym einer apokrinen Schweißdrüse. b) Iα6 und Nestin doppelt positive Zellen konnten ebenfalls *in vitro* detektiert werden. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 µm

Die Expression der oben erwähnten Marker könnte bedeuten, dass Nestin-positive Zellen im Mesenchym der Schweißdrüsen eine Vielzahl von Aufgaben der Homöostase und der Regeneration übernehmen könnten. Aufgrund der nachhaltigen *in vitro* Expression dieser Marker könnte dieses Potential ebenso in den SGSCs konserviert sein. Die konstante Genexpression über die Passagen legt nahe, dass die SGSCs ihr Stammzellpotential auch während der *in vitro* Kultivierung aufrechterhalten konnten. Zur Unterscheidung, ob die SGSCs eher epidermalen oder mesenchymalen Ursprungs sind, eignet sich die Iα6 Expression nicht, da es *in vitro* sowohl von Keratinozyten als auch von MSCs exprimiert wird (Jones and Watt, 1993; Lee *et al.*, 2009). Die unterschiedliche Iα6 Expression der SGSCs könnte aber genutzt werden, um Iα6 stark positive Zellen im FACS zu selektieren und damit potentere Zellen anzureichern. Dieses Verfahren wurde auch schon für andere Iα6 positive Stammzellpopulationen durchgeführt (Blanpain *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1998). Des Weiteren könnte die Iα6 Expression auch bei der Isolation, zur Anreicherung Nestin-positiver Zellen aus der humanen Achselhaut, verwendet werden.

Die ähnliche Expression der SGSCs und der EpiSCs von K7 und K19 in Kombination mit Iα6 lässt die Vermutung zu, dass die SGSCs eine Stammzellpopulation, ähnlich zu der der Epidermis darstellt. Gegen diese Vermutung spricht die fehlende

Expression von K14 der SGSCs. K14 wird in mehrschichtigem Epithel von basalen Zellen (Sinha and Fuchs, 2001) und im Haarfollikel in der äußeren Haarwurzelscheide (Gho *et al.*, 2004) exprimiert. Zudem kann K14 im mehrschichtigen Epithel der Schweißdrüsengänge, sowie in den myoepithelialen Zellen (Purkis *et al.*, 1990) nachgewiesen werden. Im sezernierenden Anteil der Schweißdrüsen besteht nur ein einschichtiges bzw. gemischtes, aber kein mehrschichtiges Epithel (Purkis *et al.*, 1990). Das bedeutet, dass die SGSCs aufgrund der fehlenden K14 Expression höchstwahrscheinlich keine Subpopulation der basalen Zellen des Schweißdrüsengangs bzw. der myoepithelialen Zellen der Schweißdrüsenendstücke darstellen. Dies unterscheidet die SGSCs möglicherweise von den ekkrinen Schweißdrüsenzellen der Arbeitsgruppe von Biedermann und Kollegen (Biedermann *et al.*, 2010).

Ein weiterer Unterschied zwischen den SGSCs und den EpiSCs zeigte sich in der Expression von p63. p63 ist ein Transkriptionsfaktor und Wächter über den programmierten Zelltod und Instandhalter des proliferativen Potentials von embryonalen und adulten, epithelialen Stammzellen (Li *et al.*, 2008; Senoo *et al.*, 2007). Es ist somit ein Schlüsselprotein zur Aktivierung der Stratifizierung (Koster and Roop, 2004) und reguliert zudem die Expression von extrazellulären Matrixadhäsionsmolekülen wie Integrin $\alpha 6 \beta 4$ (Carroll *et al.*, 2006). *In situ* kann p63 in den Basalzellen der Epidermis (Blanpain and Fuchs, 2007), der Haarfollikel und der Schweißdrüsen detektiert werden. Die Funktion von p63 wurde fast ausschließlich im Zusammenhang mit der Epidermis untersucht, über dessen Funktionen in anderen Geweben ist nur sehr wenig bekannt. Die Arbeitsgruppe von Carroll und Kollegen untersuchte p63 im Zusammenhang mit der Milchdrüse und erkannte auch dort die entscheidende Funktion im Zusammenspiel mit den Integrinen bei der Entwicklung und Integrität der Milchdrüsenstammzellen (Carroll *et al.*, 2006). p63 wurde von den EpiSCs nukleär, von den SGSCs aber nur im endoplasmatischen Retikulum exprimiert. p63 lag somit als Protein vor war aber nicht funktionell im Kern lokalisiert. Dies könnte bedeuten, dass das Potential zur terminalen, epithelialen Differenzierung vorhanden war, aber die entscheidenden Signale zur Stratifizierungsaktivierung durch p63 fehlten.

Dies führt zur Annahme, dass die SGSCs aus Schweißdrüsen-assoziierten Stammzellen hervorgehen, welche *in vitro* in der Lage sind spontan in Zelltypen des einfachen Epithels zu differenzieren. Diese sind aber spontan nicht fähig in Zelltypen

mehrschichtigen Epithels zu differenzieren. Eine Aussage, ob die SGSCs Stammzellen aus mesenchymlalem Gewebe darstellen und spontan in Zellen des einfachen Epithels differenzieren, oder ob die SGSCs ektodermalen Ursprungs sind und unter den durchgeführten Kulturbedingungen nicht in Zellen des mehrschichtigen Epithels differenzieren können, konnte hier nicht eindeutig getroffen werden.

Ob die SGSCs unter *in situ* Bedingungen in Zellen des mehrschichtigen Epithels differenzieren konnten wird später in dieser Arbeit noch erläutert. Schlussfolgernd ist festzustellen, dass die SGSCs und die EpiSCs sehr potente, aber unterschiedliche Stammzellpopulationen darstellen.

Zur Abschätzung des kompletten Differenzierungspotentials der SGSCs, wurde eine induzierte Differenzierung über sogenannte *organoid bodies* (OBs) verwendet. Diese Methode stammt von den ESCs, welche sich unter diesen Kulturbedingungen zu Aggregaten, sogenannten *embryonic bodies* (EBs), zusammenlagern und in Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter ausdifferenzieren können (Guan *et al.*, 1999; Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000). Diese Methode wurde außerdem gezielt zur Differenzierung von ESCs, unter Zugabe von Wachstumsfaktoren, in neurale Progenitoren verwendet (Schuldiner *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Eine induzierte Differenzierung in Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter konnte schon für adulte Stammzellen aus exokrinem Gewebe gezeigt werden (Kruse *et al.*, 2004b). Für die SGSCs konnte ebenfalls eine Differenzierung in Zelltypen der 3 embryonalen Keimblätter gezeigt werden. Eine verstärkte Expression gegenüber der spontanen Differenzierung konnte für ektodermale Gene (NF L, NF M, NF H, Col7 α und Involucrin) und Proteine (β 3T und NF) nachgewiesen werden. Die verstärkte Differenzierung in ektodermale Zelltypen lässt vermuten, dass der Ursprung der SGSCs ektodermale Progenitoren sind.

4.4.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen SGSCs und BMSCs

Der Vergleich der SGSCs mit mesenchymalen Stammzellen begründet sich in der Lokalisation Nestin-positiver Zellen im Mesenchym der Schweißdrüsen und der morphologischen Ähnlichkeiten zu den MSCs *in vitro*. Zur Untersuchung der SGSCs und BMSCs wurde eine vergleichende Oberflächenproteinexpressionsanalyse der mesenchymalen Marker CD9, CD29, CD44 und CD105 mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. CD Moleküle sind transmembrane Glykoproteine und erfüllen

Funktionen der Adhäsion, Migration, Differenzierung und Signaltransduktion. CD9 bindet unter anderem an CD29 (Integrin $\beta 1$) (Maecker *et al.*, 1997; Okochi *et al.*, 1997). CD29 interagiert wiederum mit $\alpha 6$ und ist für die Aufrechterhaltung des Stammzellpotentials verantwortlich (Jones and Watt, 1993; Levy *et al.*, 2000; Rodin *et al.*, 2010). CD44 wird ubiquitär exprimiert und bindet an extrazelluläre Matrixproteine wie Hyaluronsäure (Ponta *et al.*, 2003). CD105 ist Bestandteil des TGF- β Rezeptor-Komplexes und damit ein entscheidender Faktor während der Wundheilung (Valluru *et al.*, 2011).

SGSCs und BMSCs zeigten ein identisches Expressionsprofil. Beide Stammzellpopulationen exprimierten die Oberflächenproteine CD9, CD29 und CD105 mit 20-50 %. CD44 wurde von 60-90 % der Zellen exprimiert. Im Vergleich zu den Literaturangaben waren die Expressionen der BMSCs von CD29, CD44 und CD105 eher gering. Diese Proteine werden in der Regel von 60-100 % der BMSCs exprimiert (Li *et al.*, 2006; Vishnubalaji *et al.*, 2012). CD9 wird von MSCs aus Fettgewebe mit 20-30 % exprimiert (Kim *et al.*, 2007). In der Literatur werden BMSCs fast ausschließlich in den Passagen 2-4 benutzt, dagegen wurden die BMSCs in der vorliegenden Arbeit zwischen den Passagen 12-16 verwendet. Dieser Umstand könnte die geringere Expression der Oberflächenproteine erklären. Von Jiang und Kollegen konnte schon gezeigt werden, dass BMSCs über 80 Passagen kultivierbar sind (Jiang *et al.*, 2002). Aufgrund der fehlenden Standardisierung im Umgang mit MSCs ist eine Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenproteine nicht immer eindeutig. Zudem scheint die Oberflächenproteinexpression kein starrer Zustand zu sein, sondern spiegelt auch den momentanen Zustand der Zellen wieder, welcher von vielen Faktoren beeinflusst werden kann. Unkalkulierbare Schwankungen der Proteinexpression durch extrinsische Faktoren während der *in vitro* Kultivierung bei adulten Stammzellen wurden schon von Ciba und Kollegen beschrieben (Ciba *et al.*, 2009). Schwankungen der Oberflächenproteinexpression, innerhalb aber auch zwischen den Zellpopulationen der SGSCs, zeigten sich auch in dieser Arbeit. Zur Validierung der Ergebnisse sollten die Oberflächenproteinanalysen mit denen frisch isolierter Zellen aus den Schweißdrüsen verglichen werden. Dadurch könnten die durch die Zellkultivierung auftretenden Artefakte identifiziert werden.

Nach den bisherigen Ergebnissen glich das Oberflächenexpressionsprofil der SGSCs den BMSCs, da sie neben CD9, CD29 und CD44 auch CD105 exprimierten.

Ein eindeutigeres Unterscheidungskriterium zwischen den SGSCs und den BMSCs, als die Oberflächenproteinexpression, ist ihr mesodermales Differenzierungspotential. Zur Abschätzung des kompletten mesodermalen Differenzierungspotentials der SGSCs wurde eine gerichtete Differenzierung mittels löslicher Faktoren verwendet, um bestimmte Zelltypen gezielt zu induzieren und anzureichern. Für mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, konnte die mesodermale Differenzierung in chondrogene, adipogene und osteogene Zelltypen schon vielfach gezeigt werden (Pittenger *et al.*, 1999; Vishnubalaji *et al.*, 2012). Für die SGSCs konnte in dieser Arbeit eine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden. Dagegen konnte, mit den hier verwendeten Verfahren, keine adipogene und osteogene Differenzierung bei den SGSCs induziert werden. Die BMSCs differenzierten, trotz ihrer hohen Passage, in alle 3 mesodermalen Differenzierungsrichtungen. Dies konnte bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden. Außerdem demonstrierte es, dass die geringere Oberflächenproteinexpression von CD29, CD44 und CD105 keinen Einfluss auf die Differenzierungskapazität der BMSCs hatte.

4.4.3 Mögliche Identität der SGSCs

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SGSCs eine Stammzellpopulation darstellt, welche spontan ektodermale Gene und Proteine exprimierte. Diese konnten durch eine Induktion in ihrer Expression noch verstärkt werden. Dennoch zeigten die SGSCs keine spontane Proteinexpression mehrschichtigen Epithels. In ihrem Phänotyp und der Oberflächenproteinexpression ähnelten die SGSCs den BMSCs. Jedoch zeigten die SGSCs eine eingeschränkte Induzierbarkeit der Mesodermdifferenzierung. Eine mögliche Erklärung könnte in der Isolationsmethode liegen. Um das Auswachsen der Stammzellen aus den isolierten Schweißdrüsen zu ermöglichen, etablierte Frau Matthießen (geborene Petschnik) in ihrer Arbeit eine Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen Typ IV (Petschnik, 2011). Kollagen Typ IV ist Bestandteil der extrazellulären Matrix der Basalmembran. Es konnte schon gezeigt werden, dass extrazelluläre Matrixproteine der Basalmembran die Proliferation mesenchymaler Stammzellen, unter Erhaltung der Differenzierungsfähigkeit, verbessern (Lindner *et al.*, 2010; Matsubara *et al.*, 2004). Aufgrund der Gewinnung der Zellen durch das Auswachsen auf einer beschichteten Zellkulturschale könnte eine Interaktion mit den extrazellulären Matrixproteinen zu

einer Differenzierung der Nestin-positiven Zellen in Epithelzellen geführt haben. Dieser Umstand könnte den mesenchymalen Charakter und die spontane epitheliale Differenzierung der SGSCs erklären. Die BMCSs zeigten ebenfalls eine spontane Expression epithelialer Proteine. Die Expression von K7 und K19 war aber sehr viel geringer als bei den SGSCs (Daten nicht gezeigt). Dass die Verwendung einer anderen Kultivierungsoberfläche zur Isolation eines anderen Zelltyps aus humanen Schweißdrüsen führen kann, haben Biedermann und Kollegen gezeigt (Biedermann *et al.*, 2010). Sie verwendeten einen Feeder-Layer aus murinen Fibroblasten, auf dem die isolierten Schweißdrüsen aus humaner Haut platziert wurden. Auf diese Weise erhielten sie eine epitheliale Zellpopulation mit charakteristischen Eigenschaften von Keratinozyten.

Die Vermutung, dass es sich bei den SGSCs und den ekkrinen Schweißdrüsenzellen von Biedermann und Kollegen um den gleichen Zelltypen handeln könnte, wurde von Schon und Kollegen beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass myoepitheliale Zellen nach Art ihrer Kultivierung eine reversible Transition durchlaufen (Schon *et al.*, 1999). Eine Kultivierung myoepithelialer Zellen auf einem Feeder-Layer führte dabei zu einer epithelialen Zellmorphologie. Im Unterschied zu den Keratinozyten exprimierten sie aber kein E-Cadherin. Wurden die myoepithelialen Zellen dagegen ohne Feeder-Layer kultiviert, nahmen sie eine Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie an und exprimierten kein K14 mehr. Dies könnte bedeuten, dass die SGSCs eine myoepitheliale Stammzellpopulation darstellen könnte, welche *in vitro* eine Fibroblasten-ähnliche Struktur zeigte und kein K14 mehr exprimierte.

Trotz der ähnlichen *in vitro* Eigenschaften der myoepithelialen Zellen, beschrieben von Schon und Kollegen, zu den SGSCs, zeigten sich Unterschiede in der *epidermal growth factor* (EGF) und Hydrocortison abhängigen Proliferation der myoepithelialen Zellen und ihrer fehlenden K19 Expression (Schon *et al.*, 1999). Zudem konnte die Arbeitsgruppe von Biedermann und Kollegen die Expression von E-Cadherin in den ekkrinen Schweißdrüsenzellen nachweisen (Daten nicht veröffentlicht). Diese identifiziert die ekkrinen Schweißdrüsenzellen als Keratinozyten und widerlegt die Vermutung, dass es sich bei den ekkrinen Schweißdrüsenzellen von Biedermann und Kollegen und den SGSCs um gleiche Zelltypen handeln könnte.

Um eine mögliche reversible epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), wie sie von Schon und Kollegen für myoepitheliale Zellen beschrieben wurde, näher untersuchen zu können, sollten die SGSCs in weiteren Versuchen auf einem Feeder-Layer aus

murinen Fibroblasten kultiviert werden. Anschließend sollte die Morphologie und die Proteinexpression mit epithelialen Zellen verglichen werden.

Eine EMT ist ein zelluläres Transdifferenzierungsprogramm von epithelialen in mesenchymale Zelltypen und spielt eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei regenerativen Mechanismen und der Metastasierung von Krebszellen (Kalluri and Weinberg, 2009). Eine besondere Stammzellpopulation, die Neuralleistenzellen (NLZ) entstehen an der Grenzschicht zwischen Neuralplatte und dem Ektoderm. Diese NLZ durchlaufen die EMT und migrieren durch den Körper (Tucker, 2004). In einigen Publikationen wird die ungewöhnliche neurale Differenzierungskapazität von Haut-abgeleiteten Stammzellen mit dem Vorhandensein von NLZ in der Haut beschrieben (Fernandes *et al.*, 2004; Sieber-Blum and Grim, 2004; Wong *et al.*, 2006). Obwohl die von NLZ exprimierten Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel *slug* oder *snail* (Fernandes *et al.*, 2004) in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, kann aufgrund der außergewöhnlichen ektodermalen Differenzierungskapazität der SGSCs nicht ausgeschlossen werden, dass der Ursprung der SGSCs auch NLZ sein könnten.

Schlussfolgernd ist festzustellen, dass die SGSCs sowohl Eigenschaften der EpiSCs, der BMSCs, der myoepithelialen Zellen als auch der NLZ zeigten und eine eindeutige Bestimmung des Ursprungs der SGSCs daher nicht möglich war. Die Neigung der SGSCs in Zelltypen des Ektoderms zu differenzieren macht sie aber unabhängig von ihrem Ursprung im Gewebe für verschiedene zellbasierte Therapien, zum Beispiel für die Hautwundheilung oder neurodegenerative Erkrankungen sehr interessant. Für Nestin-positive Zellen aus der Haut von Säugetieren und deren Anhangsgebilden konnte eine *in vitro* Differenzierung in Neuronen, Gliazellen, Keratinozyten, Muskelzellen und Melanozyten gezeigt werden (Amoh *et al.*, 2005; Gingras *et al.*, 2007; Hoffman, 2007). *In vivo* trugen die Nestin-positiven Zellen zur Regeneration von peripheren Nerven und Rückenmarksverletzungen bei (Amoh *et al.*, 2012; Amoh and Hoffman, 2010; Amoh *et al.*, 2009a).

4.5 Verbesserte Hautwundheilung durch SGSCs

Für die klinische Anwendung von multipotenten humanen Stammzellen ist eine leicht verfügbare Quelle von großem Interesse. Humane Schweißdrüsen, die dem Patienten autolog entnommen werden können, stellen eine neue, vielversprechende Quelle für multipotente Stammzellpopulationen dar. Bei sehr großflächigen

Verletzungen der Haut stoßen konventionelle Therapien wie Eigenhauttransplantationen an ihre Grenzen. Trotzdem können die heute verfügbaren Hautersatzprodukte die Eigenhauttransplantationen noch nicht vollständig ersetzen, da noch immer Einschränkungen, wie unzureichende Einheilung und/oder mechanische Instabilität des Hautersatzes oder ein Fehlen von differenzierten Strukturen, auftreten. An dem Ziel einen Hautersatz herzustellen, der alle funktionellen und strukturellen Fähigkeiten der gesunden menschlichen Haut bietet und diese vollständig ersetzen kann, arbeitet auch die Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie.

Es konnte schon gezeigt werden, dass ein mit pankreatischen Stammzellen besiedelter Hautersatz (Matriderm, Integra) im Mausmodell zu einer beschleunigten Wundheilung und einer verbesserten Vaskularisierung bei Vollhautdefekten beiträgt (Egana *et al.*, 2009a; Salem *et al.*, 2009). Daher galt der Einsatz von Stammzellen aus humanen Schweißdrüsen ebenfalls als sehr erfolgsversprechend. Für eine Analyse der zelltherapeutischen Nutzbarkeit der SGSCs wurden mit Kooperationspartnern verschiedene *in vitro*, *in situ* und *in vivo* Experimente durchgeführt.

Das im Klinikum rechts der Isar in München etablierte Vollhautwundheilungsmodell in der Nacktmaus wurde verwendet, um eine Matrix-gestützte dermale Regeneration der transplantierten SGSCs zu untersuchen. Damit konnte gezeigt werden, dass die SGSCs die Vaskularisierung verbesserten (Danner *et al.*, 2012). Das Potential der SGSCs für einen Einsatz zur Wundheilungsverbesserung konnte zuvor durch *in vitro* Analysen ermittelt werden. So konnte gezeigt werden, dass die SGSCs in einer angiogenetisch induzierenden Umgebung wie endotheliale Zellen agierten. Die Migrations- und Proliferationskapazität der SGSCs stieg in endotheliale Wachstumsmilieu und die Zellen lagerten sich auf Matrigel zu gefäßähnlichen Strukturen aneinander. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die SGSCs zahlreiche wundheilungsfördernde Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernierten. Diese wirken immunmodulatorisch, angiogenesefördernd oder sind entscheidend für den Matrixumbau.

Da sich Ergebnisse aus Tierversuchen häufig nicht auf den Menschen übertragen lassen, fanden weitere Analysen in einem humanen organotypischen Wundheilungsmodell statt. Diese Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit der SGSCs wurden in einem Kooperationsprojekt mit der experimentellen Dermatologie

der Universität Lübeck durchgeführt. Das ursprüngliche Verfahren der Kultivierung humaner Hautbiopsien (Lu *et al.*, 2007) und die Methode der Biopsie-Verletzung (Moll *et al.*, 1998) wurde von den Mitarbeitern der experimentellen Dermatologie zu einem neuartigen *punch in a punch* Modell weiterentwickelt. Dazu wurde eine humane Hautstanzenbiopsie (Ø 4 mm) mit einer zweiten kleineren Stanze (Ø 2 mm) zentral verletzt, so dass eine definierte innere Wunde entstand. In diesem Modell konnten Zelltransplantationsexperimente der SGSCs *in situ* simuliert werden. In die verwundete Hautstanze wurden Nanopartikel-markierte SGSCs transplantiert und über 6 Tage *in vitro* an der Medium-Luft-Grenze kultiviert. Die SGSCs zeigten dabei einen positiven Effekt auf die Reepithelialisierung und eine erhöhte Proliferation der migrierenden Keratinozyten in der epithelialen Zunge (Liao *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass die Anzahl der Blutgefäße erhöht war. Dies führte zu einem vollständigen Wundverschluss nach 6 Tagen. Bei den unbehandelten Kontrollen war dieser Wundheilungseffekt nicht nachweisbar. Die transplantierten SGSCs konnten im Wundbett anhand ihrer Nanopartikel-Markierung detektiert werden. Insgesamt bewirkten die SGSCs eine verbesserte Reepithelialisierung und eine verstärkte Angiogenese. Somit konnte das Potential der SGSCs zur Wundheilungsförderung *in vitro*, *in situ* und *in vivo* nachgewiesen werden.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten das Potential von Stammzellen aus Schweißdrüsen für die Wundheilung nachweisen. So gelang es Biedermann und Kollegen, Stammzellen aus humanen ekkrinen Schweißdrüsen zu isolieren, welche einen positiven Einfluss auf die Wundheilung haben (Biedermann *et al.*, 2010). Die Arbeitsgruppe von Lu und Kollegen untersuchten kürzlich das *in situ* Wundheilungspotential der ekkrinen Schweißdrüsen von Mäusen (Lu *et al.*, 2012). Dabei identifizierten sie Zellen des Schweißdrüsengangs als Progenitoren bei der epidermalen Regeneration. Zu dem gleichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe von Rittie und Kollegen, welche das Wundheilungspotential von humanen ekkrinen Schweißdrüsen untersuchten (Rittie *et al.*, 2012). Die Progenitoren in den sezernierenden Kompartimenten der Schweißdrüsen führten bei der Maus zu einer Regeneration der myoepithelialen und luminalen Zellen, beteiligten sich aber nicht an der epidermalen Wundregeneration (Lu *et al.*, 2012). In beiden *in situ* Untersuchungen wurde eine mögliche Beteiligung der Stammzellen aus dem Schweißdrüsenmesenchym an der Wundregeneration vernachlässigt. Obwohl von Lu

und Kollegen proliferierende Zellen im Schweißdrüsenmesenchym während der Wundheilung nachgewiesen werden konnten.

Die positiven Effekte der transplantierten SGSCs auf die Reepithelialisierung und Angiogenese bei der Hautwundheilung könnte mit einer echten Differenzierung in den vor Ort benötigten Zelltyp oder/und die Ausschüttung von wundheilungsfördernden Zytokinen und Wachstumsfaktoren begründet werden.

In einem Membran-basierten Zytokin-Array wurde die Ausschüttung von Zytokinen der SGSCs analysiert. Es wurden die folgenden Faktoren nachgewiesen: MCP-1, Serpin E1, GRO α , IL 6 und IL 8, welche alle einen positiven Effekt auf die Wundheilung haben können. Serpin E1 wurde am stärksten exprimiert und ist ein Proteaseinhibitor und somit entscheidend am Matrixumbau und an Migrationsprozessen beteiligt (Providence and Higgins, 2004). Die Chemokine MCP-1, IL 8 und GRO α spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten und Endothelzellen (Werner and Grose, 2003). GRO α und IL 8 gehören zudem den ELR-Chemokinen an, welche als Promotoren der Angiogenese gelten (Engelhardt et al., 1998; Strieter et al., 1995). IL 6 ist ein proinflammatorisches Zytokin und wirkt ebenfalls chemotaktisch auf Leukozyten (Barrientos et al., 2008). IL 8, GRO α und IL 6 spielen, durch ihre mitogene Wirkung auf Keratinozyten, eine Rolle während der Reepithelialisierung (Engelhardt et al., 1998; Gallucci et al., 2004; Michel et al., 1992; Sato et al., 1999). Die SGSCs waren somit in der Lage Faktoren zu sezernieren, welche sowohl immunmodulatorische als auch angiogenetische Eigenschaften haben und bei dem Gewebeumbau eine Rolle spielen. Somit konnte auch in dieser Arbeit das parakrine Potential der SGSCs nachgewiesen werden.

Eine ausführliche Untersuchung zur Zytokin-Sekretion der SGSCs wurde von Martina Elser in ihrer Masterarbeit durchgeführt (Elsner, 2012). Darin untersuchte sie die induzierenden Faktoren der Sekretion durch hypoxische, immunologische und gewebespezifische Mediatoren, durch die Kultivierung der SGSCs bei einem geringen Sauerstoffgehalt, durch die Stimulation mit Lipopolysaccharid und durch die Kokultur mit Hirngewebe. Dabei zeigte sich, dass die SGSCs die Faktoren IL 6, IL 8 und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) vermehrt bei der parakrinen Interaktion mit der Hirnbiopsie sezernierten. IL 6 und VEGF unterlagen zusätzlich einem hypoxischen Einfluss. Diese Zytokine können zu einer verbesserten Reepithelialisierung und Angiogenese beitragen und besitzen ebenfalls

zytoprotektive Eigenschaften. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die SGSCs ihre wundheilungsfördernden Eigenschaften mithilfe der parakrinen Signalvermittlung durch Interaktion mit den verschiedenen Zellen und dem Immunsystem gewährleisten. Diese gegenseitige Stimulation kann die Wundheilung befördern und ist ein enormer Vorteil gegenüber dem Einsatz von Wachstumsfaktoren allein. Dies macht die SGSCs zu idealen Kandidaten für stammzellbasierende Therapien.

Eine echte Differenzierung der SGSCs in die benötigten Zelltypen konnte bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Von Danner und Kollegen konnte die Anwesenheit der transplantierten Zellen in der Wunde nach 2 Wochen nicht mehr gezeigt werden (Danner *et al.*, 2012). Da die Zellen unmarkiert transplantiert wurden, war die Detektion der humanen Zellen aber eher ein technisches Problem. Da die SGSCs *in vitro* Transkripte von α SMA und vWF exprimierten, welche entscheidend sind in der Differenzierung von Endothelzellen, konnte aber eine direkte Differenzierung der SGSCs in Blutgefäße nicht ausgeschlossen werden.

Bei Liao und Kollegen waren die SGSCs Nanopartikel-markiert und konnten nach einer 6tägigen *in vitro* Kultivierung im Wundbett detektiert werden (Liao *et al.*, 2012). Sie konnten weder in der Neopidermis noch in den neu gebildeten Gefäßen nachgewiesen werden. Da sich Nanopartikel bei der Proliferation aber sehr schnell ausdünnen, ist es dennoch nicht auszuschließen, dass SGSCs in Keratinozyten und/oder Endothelzellen differenziert sind. Zudem ist ein Zeitraum von 6 Tagen höchstwahrscheinlich zu kurz um die Funktion der SGSCs während der Wundheilung ausreichend beurteilen zu können.

Die angiogenesefördernden Eigenschaften Nestin-positiver Zellen konnten schon von anderen Gruppen gezeigt werden (Amoh *et al.*, 2004; Mokry *et al.*, 2008). Aihara und Kollegen identifizierten Nestin als spezifischen Marker für proliferatives Endothel (Aihara *et al.*, 2004). Nestin wird während der humanen Embryonalentwicklung und der Angiogenese (Mokry *et al.*, 2004), sowohl von Endothelzellen, den glatten Muskelzellen als auch den Perizyten exprimiert (Mokry *et al.*, 2008). Bei der Ausdifferenzierung der Zellen wird Nestin von anderen Intermediärfilamenten, wie Vimentin ersetzt. Alliot und Kollegen konnten im Gehirn der Maus ebenfalls eine Nestin Expression in Perizyten, periendothelialen Zellen und Endothelzellen in sich

bildenden Gefäße detektieren. *In vitro* behielten die isolierten Zellen ihre Nestin Expression bei (Alliot *et al.*, 1999). Nestin konnte somit als Angiogenesemarker sowohl in humanen als auch murinen Geweben identifiziert werden.

Perizyten sind Zellen, die von der Basalmembran der Kapillaren, Arteriolen oder Venolen umgeben sind und diese mit ihren Fortsätzen umschließen (Allt and Lawrenson, 2001). Funktionsähnliche Zellen in Arterien und Venen werden periendotheliale Zellen genannt (Alliot *et al.*, 1999). Diese Zellen befinden sich in allen vaskularisierten Geweben. Endothelzellen stammen von Hämangioblasten ab, welche die gemeinsamen Vorläufer von endothelialen und hämatopoetischen Stammzellen darstellen (Mokry *et al.*, 2008; Rafii *et al.*, 2002). Somit können Endothelzellen von MSCs, Perizyten und residenten Endothelzellen gebildet werden. Morky und Kollegen konnten residente Nestin-positive Zellen im Epithel von größeren Blutgefäßen nachweisen. Eine Funktion vermuten sie in der Adaption an dynamische Prozesse der Gefäße während des Wachstums oder der Wundheilung (Mokry *et al.*, 2008). Residente Nestin-positive Zellen konnten auch in dieser Arbeit im Mesenchym von Schweißdrüsen detektiert werden. Diese konnten größtenteils, aber nicht ausschließlich an der Basalmembran von Gefäßen im Schweißdrüsenmesenchym nachgewiesen werden (Abb. 33).

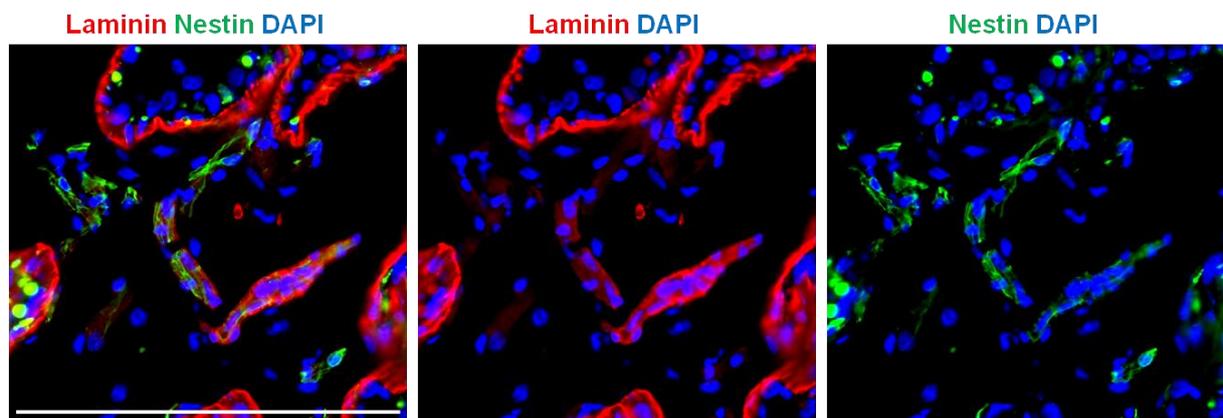


Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung einer apokrinen Schweißdrüse mit Laminin und Nestin. Die Nestin-positiven Zellen im Mesenchym der Schweißdrüsen kolokalisierten mit Laminin. Laminin wird von der Basalmembran der Schweißdrüsen als auch der Basalmembran der Blutgefäße exprimiert. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstab entspricht 100 µm

Schweißdrüsen sind von einem üppigen Kapillarnetz umspannt (Kennedy *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2011). Dies lässt vermuten, dass die Nestin-positiven Zellen im Schweißdrüsenmesenchym Perizyten darstellen könnten.

Zusätzlich zu den angiogenesefördernden Eigenschaften der Perizyten konnten Paquet-Fifield und Kollegen eine verbesserte epitheliale Zellproliferation nach der Transplantation von Perizyten nachweisen (Paquet-Fifield *et al.*, 2009). Diese Studie unterstützt somit die Ergebnisse aus dem *in situ* Wundheilungsmodell, bei dem die transplantierten SGSCs nicht nur die Angiogenese sondern auch die Reepithelialisierung verbesserten. Wenn die SGSCs eine abgeleitete Stammzellpopulation der Perizyten darstellen, dann könnte dies die wundheilungsfördernden Eigenschaften der SGSCs *in vivo*, *in situ* und *in vitro* erklären.

Caplan und Kollegen stellten die Theorie auf, dass alle gewebständigen MSCs von Gefäßen stammen und somit differenzierte Pericyten repräsentieren (Caplan and Correa, 2011). Ohne zu viele verschiedene Begriffe von Stammzellpopulationen mit ähnlichen Funktion zu verwenden, fasst Caplan zwei entscheidende Funktionen dieser Zellen während der Wundheilung zusammen: zum einen sind sie entscheidende Immunmodulatoren und zum anderen haben sie trophische Eigenschaften. Durch die Sekretion verschiedener Faktoren inhibieren sie die Apoptose und die Narbenbildung, stimulieren die Angiogenese und wirken mitogen. Da gerade die fehlende Vaskularisierung der limitierende Faktor für die Herstellung von *in vitro* Hautersatz ist (Bouchie, 2002), ist die Gewinnung einer angiogenesefördernden Stammzellpopulation wie den SGSCs von enormer Bedeutung.

Aktuelle Studien untersuchen eingehend, ob die angiogenesefördernden Effekte der SGSCs auf die parakrin sezernierten Zytokine und/oder auf die direkte Differenzierung in Endothelzellen zurückzuführen sind. Des Weiteren werden Untersuchungen durchgeführt, welche die Vermutung untermauern, dass es sich bei den Nestin-positiven Zellen im Mesenchym humaner Schweißdrüsen um Perizyten handelt.

Neben der Vaskularisierung sind auch die fehlenden Hautanhangsgebilde in einem Hautersatz problematisch. Daher ist man an einer *in vitro* Entwicklung oder einer *in vivo* Induktion von Hautanhangsgebilden im Wundbereich sehr interessiert. Zur

Regeneration der Hautanhangsgebilde wäre ein Einsatz der multipotenten SGSCs denkbar. Während die SGSCs bei der Wundheilung, die Reepithelialisierung und Angiogenese erheblich fördern konnten, konnte eine spontane Differenzierung *in situ* oder *in vivo* in Schweißdrüsen nicht beobachtet werden. Ebenso führte eine 3D Kultivierung in OBs nicht zu einer Induktion Schweißdrüsen-assoziiierter Gene oder Proteine. Biedermann und Kollegen konnten ebenfalls keine Schweißdrüsenbildung *in vivo* beobachten. Sie begründeten dies mit einer irreversiblen Transition von Schweißdrüsenzellen in epidermale Keratinozyten (Biedermann *et al.*, 2010).

Die Schwierigkeit einer gezielten Differenzierung besteht in der Entschlüsselung der individuellen Bedingungen und Faktoren, die eine Stammzelle zu den gewünschten Zelltypen differenzieren lassen. Arbeiten zur Hautwundheilung mit MSCs zeigten *in vivo* Zellanhäufungen (Huang *et al.*, 2012; Sheng *et al.*, 2009), welche aber nicht als funktionelle Schweißdrüsen identifiziert werden konnten und sich teilweise wieder auflösten. Die Möglichkeit der gezielten Differenzierung von Stammzellen unter spezifischen Kultivierungsbedingungen in Hautanhangsgebilde konnte schon für den Haarfollikel gezeigt werden (Horland *et al.*, 2011).

Aufgrund der Komplexität der Differenzierungsvorgänge zur Generierung von Schweißdrüsen aus SGSCs wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz zur Herstellung eines Hautersatzes mit funktionellen Schweißdrüsen verfolgt. Nach dem Vorbild von Navsaria und Kollegen, welche Haarfollikel in einen Hautersatz transplantierten und damit eine verbesserte Wundheilung und funktionelle Haarfollikel generieren konnten (Navsaria *et al.*, 2004), wurden die frisch isolierten Schweißdrüsen in eine Kollagenmatrix transplantiert und kultiviert. Dabei zeigte sich nicht nur ein Anstieg der metabolischen Aktivität der Schweißdrüsen über die Kultivierungszeit, sondern es konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl die Morphologie als auch eine mögliche Funktionalität der Schweißdrüsen erhalten blieb. Des Weiteren konnten immer noch Nestin-positive Zellen im Mesenchym nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit eines funktionellen, sofort verfügbaren Hautersatzes mit autolog transplantierten Schweißdrüsen und Haarfollikeln.

5 Fazit

Humane Schweißdrüsen bieten sich als potente, leicht verfügbare Stammzellquelle an und könnten vor allem für autologe Therapien ein breites Anwendungspotential eröffnen. Zum einen könnten sie zur Herstellung einer multipotenten Nestin-positiven Stammzellpopulation dienen. Diese ist in der Lage, durch die Sekretion verschiedener Faktoren und eine mögliche Differenzierung in die benötigten Zelltypen, die Wundheilung erheblich zu verbessern. Zum anderen könnten die nativen Schweißdrüsen direkt zur Transplantation verwendet werden um einen funktionellen Hautersatz zu generieren.

6 Ausblick

Die Erfahrungen und Entwicklungen, die in dieser Arbeit hinsichtlich einer Optimierung der Wundheilung gewonnen wurden, sollen klinisch nutzbar gemacht werden, um sie langfristig am Patienten anwenden zu können. Dabei wird der nächste Schritt die Anpassung des Isolationsverfahrens an *good manufacturing practice* (GMP) –Richtlinien sein. Ziel ist es, für die Gewinnung der Zellen eine Herstellererlaubnis zu erlangen und eine Genehmigung für die zelltherapeutische Nutzung zu erhalten, so dass diese Zellen als *advanced therapeutical medicinal product* (ATMP) genutzt werden könnten. Ein routinemäßiger therapeutischer Einsatz der SGSCs ist kaum ohne die gleichzeitige Entwicklung von Methoden zur Langzeitlagerung vorstellbar. Hierfür soll eine Zellbank etabliert werden, vergleichbar mit den existierenden für hämatopoetische Stammzellen oder Nabelschnurblut. Zur Kryokonservierung von zellbasierten Hautersatzprodukten, welche sofort verfügbar wären, werden an der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie zurzeit neue Technologien entwickelt.

7 Literaturverzeichnis

Ackermann AB (1997) *Embryologic, Histologic and Anatomic Aspects*, 2nd edn. Lea & Febiger, U.S.: Baltimore, 3-56.

Adjaye J, Huntriss J, Herwig R, BenKahla A, Brink TC, Wierling C, *et al.* (2005) Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem Cells* 23:1514-25.

Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N, *et al.* (2004) Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest* 84:1581-92.

Alliot F, Rutin J, Leenen PJ, Pessac B (1999) Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J Neurosci Res* 58:367-78.

Allt G, Lawrenson JG (2001) Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* 169:1-11.

Amoh Y, Aki R, Hamada Y, Niiyama S, Eshima K, Kawahara K, *et al.* (2012) Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *J Dermatol* 39:33-8.

Amoh Y, Hoffman RM (2010) Isolation and culture of hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells and their use for nerve and spinal cord regeneration. *Methods Mol Biol* 585:401-20.

Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Hamada Y, Kawahara K, Sato Y, *et al.* (2009a) Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem* 107:1016-20.

Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Kawahara K, Sato Y, Katsuoka K, *et al.* (2009b) Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. *Cell Cycle* 8:176-7.

Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM (2009c) Multipotent nestin-expressing hair follicle stem cells. *J Dermatol* 36:1-9.

Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM (2005) Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5530-4.

Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, *et al.* (2004) Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13291-5.

Ando I, Kukita A, Soma G, Hino H (1998) A large number of tandem repeats in the polymorphic epithelial mucin gene is associated with severe acne. *J Dermatol* 25:150-2.

Angello JC, Pendergrass WR, Norwood TH, Prothero J (1987) Proliferative potential of human fibroblasts: an inverse dependence on cell size. *J Cell Physiol* 132:125-30.

Aumuller G, Wilhelm B, Seitz J (1999) Apocrine secretion--fact or artifact? *Ann Anat* 181:437-46.

Bargmann W (1977) *Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen*. Thieme: Stuttgart, 600-4.

Barrandon Y (2007) Genetic manipulation of skin stem cells: success, hope, and challenges ahead. *Mol Ther* 15:443-4.

Barrandon Y, Green H (1985) Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5390-4.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16:585-601.

Barthel R, Aberdam D (2005) Epidermal stem cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:405-13.

Bennighoff A (1985) *Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*, vol. 13-14. Urban & Schwarzenberg: München, 565-85.

Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, *et al.* (2007) Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67:9142-9.

Biedermann T, Pontiggia L, Bottcher-Haberzeth S, Tharakan S, Braziulis E, Schiestl C, *et al.* (2010) Human eccrine sweat gland cells can reconstitute a stratified epidermis. *J Invest Dermatol* 130:1996-2009.

Biernaskie J, Paris M, Morozova O, Fagan BM, Marra M, Pevny L, *et al.* (2009) SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell* 5:610-23.

Blanpain C, Fuchs E (2007) p63: revving up epithelial stem-cell potential. *Nat Cell Biol* 9:731-3.

Blanpain C, Fuchs E (2009) Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:207-17.

Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E (2004) Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118:635-48.

- Bluff JE, Ferguson MW, O'Kane S, Ireland G (2007) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells do not contribute significantly to new vessels during incisional wound healing. *Exp Hematol* 35:500-6.
- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Roth W, Nakamura M, Chen LH, Herzog W, *et al.* (1999) Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat Cell Biol* 1:158-64.
- Bouchie A (2002) Tissue engineering firms go under. *Nat Biotechnol* 20:1178-9.
- Bouvard C, Gafsou B, Dizier B, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Boisson-Vidal C, *et al.* (2010) alpha6-integrin subunit plays a major role in the proangiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1569-75.
- Braun-Falco O, Rupec M (1968) *Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten: Apokrine Schweißdrüsen*, 267-368.
- Brouard M, Barrandon Y (2003) Controlling skin morphogenesis: hope and despair. *Curr Opin Biotechnol* 14:520-5.
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A (1994) Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81.
- Calderone A (2012) Nestin+ cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H1-9.
- Caplan AI, Correa D (2011) The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9:11-5.
- Carroll DK, Carroll JS, Leong CO, Cheng F, Brown M, Mills AA, *et al.* (2006) p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8:551-61.
- Chan KK, Zhang J, Chia NY, Chan YS, Sim HS, Tan KS, *et al.* (2009) KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:2114-25.
- Chang L, Goldman RD (2004) Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:601-13.
- Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD (2003) Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell* 14:1468-78.
- Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM (2002) Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol* 158:165-74.
- Ciba P, Sturmheit TM, Petschnik AE, Kruse C, Danner S (2009) In vitro cultures of human pancreatic stem cells: gene and protein expression of designated markers varies with passage. *Ann Anat* 191:94-103.

Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, *et al.* (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456:344-9.

Cowin P, Wysolmerski J (2010) Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003251.

Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U (1992) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci* 103 (Pt 2):589-97.

Danner S, Kremer M, Petschnik AE, Nagel S, Zhang Z, Hopfner U, *et al.* (2012) The Use of Human Sweat Gland-Derived Stem Cells for Enhancing Vascularization during Dermal Regeneration. *J Invest Dermatol* 132:1707-16.

Eaglstein WH, Falanga V (1997) Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin Ther* 19:894-905.

Ebling FJ (1976) Hair. *J Invest Dermatol* 67:98-105.

Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, Andre M, Cousin B, *et al.* (2009) Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:503-10.

Egana JT, Danner S, Kremer M, Rapoport DH, Lohmeyer JA, Dye JF, *et al.* (2009a) The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials* 30:5918-26.

Egana JT, Fierro FA, Kruger S, Bornhauser M, Huss R, Lavandero S, *et al.* (2009b) Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. *Tissue Eng Part A* 15:1191-200.

Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, *et al.* (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274:23996-4006.

Elsner M (2012) Parakrine Interaktion Haut-abgeleiteter Stammzellen mit Hirnbiopsien unter Normoxie und Hypoxie. *Masterarbeit* Lübeck.

Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R (1998) Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 153:1849-60.

Ernst N, Tiede S, Tronnier V, Kruse C, Zechel C, Paus R (2010) An improved, standardised protocol for the isolation, enrichment and targeted neural differentiation of Nestin+ progenitors from adult human dermis. *Exp Dermatol* 19:549-55.

Ersch J, Stallmach T (1999) Assessing gestational age from histology of fetal skin: an autopsy study of 379 fetuses. *Obstet Gynecol* 94:753-7.

- Falanga V, Sabolinski M (1999) A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers. *Wound Repair Regen* 7:201-7.
- Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, *et al.* (2004) A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6:1082-93.
- Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ (2008) Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:1931-8.
- Frisen J, Johansson CB, Torok C, Risling M, Lendahl U (1995) Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131:453-64.
- Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee TD, Forman SJ, Shih CC (2008) Derivation of neural stem cells from mesenchymal stemcells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev* 17:1109-21.
- Fuchs E, Horsley V (2008) More than one way to skin. *Genes Dev* 22:976-85.
- Gallucci RM, Sloan DK, Heck JM, Murray AR, O'Dell SJ (2004) Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 122:764-72.
- Gho CG, Braun JE, Tilli CM, Neumann HA, Ramaekers FC (2004) Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell culture. *Br J Dermatol* 150:860-8.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100:1249-60.
- Gingras M, Champigny MF, Berthod F (2007) Differentiation of human adult skin-derived neuronal precursors into mature neurons. *J Cell Physiol* 210:498-506.
- Göldner M (2012) Development of a design concept for a GMP-compliant stem cell isolation process. *Diplomarbeit* Hamburg.
- Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, *et al.* (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471:63-7.
- Gorjup E, Danner S, Rotter N, Habermann J, Brassat U, Brummendorf TH, *et al.* (2009) Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *Eur J Cell Biol* 88:409-21.
- Grenier G, Scime A, Le Grand F, Asakura A, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, *et al.* (2007) Resident endothelial precursors in muscle, adipose, and dermis contribute to postnatal vasculogenesis. *Stem Cells* 25:3101-10.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al.* (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81:531-5.

Guan K, Rohwedel J, Wobus AM (1999) Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30:211-26.

Guldner NW, Kajahn J, Klinger M, Sievers HH, Kruse C (2006) Autonomously contracting human cardiomyocytes generated from adult pancreatic stem cells and enhanced in co-cultures with myocardial biopsies. *Int J Artif Organs* 29:1158-66.

Hall PE, Lathia JD, Miller NG, Caldwell MA, French-Constant C (2006) Integrins are markers of human neural stem cells. *Stem Cells* 24:2078-84.

Hardy MH (1992) The secret life of the hair follicle. *Trends Genet* 8:55-61.

Haslik W, Kamolz LP, Nathschlager G, Andel H, Meissl G, Frey M (2007) First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. *Burns* 33:364-8.

Herrmann H, Aebi U (1998) Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8:177-85.

Herzog SR, Meyer A, Woodley D, Peterson HD (1988) Wound coverage with cultured autologous keratinocytes: use after burn wound excision, including biopsy followup. *J Trauma* 28:195-8.

Hoffman RM (2006) The pluripotency of hair follicle stem cells. *Cell Cycle* 5:232-3.

Hoffman RM (2007) The potential of nestin-expressing hair follicle stem cells in regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 7:289-91.

Holbrook KA, Minami SI (1991) Hair follicle embryogenesis in the human. Characterization of events in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 642:167-96.

Horland R, Lindner G, Wagner I, Atac B, Hoffmann S, Gruchow M, *et al.* (2011) Human hair follicle equivalents in vitro for transplantation and chip-based substance testing. *BMC Proc* 5 Suppl 8:O7.

Huang S, Lu G, Wu Y, Jirigala E, Xu Y, Ma K, *et al.* (2012) Mesenchymal stem cells delivered in a microsphere-based engineered skin contribute to cutaneous wound healing and sweat gland repair. *J Dermatol Sci* 66:29-36.

Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S (1996) Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 8:548-56.

Hunt DP, Morris PN, Sterling J, Anderson JA, Joannides A, Jahoda C, *et al.* (2008) A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells* 26:163-72.

Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Narva E, *et al.* (2011) Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471:58-62.

Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, *et al.* (2005) Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 23:1035-43.

Inoue T (1979) Scanning electron microscopic study of the human axillary apocrine glands. *J Dermatol* 6:299-308.

Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, *et al.* (2005) Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 11:1351-4.

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, *et al.* (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6:88-95.

Jahoda CA, Whitehouse J, Reynolds AJ, Hole N (2003) Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp Dermatol* 12:849-59.

Ji KH, Xiong J, Hu KM, Fan LX, Liu HQ (2008) Simultaneous expression of Oct4 and genes of three germ layers in single cell-derived multipotent adult progenitor cells. *Ann Hematol* 87:431-8.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-9.

Jones PH, Watt FM (1993) Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73:713-24.

Junquiera LC, Carneiro J (1991) *Haut, Integumentum commune* Springer-Verlag: Berlin.

Kajahn J, Gorjup E, Tiede S, von Briesen H, Paus R, Kruse C, *et al.* (2008) Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *Eur J Cell Biol* 87:39-46.

Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420-8.

Kamolz DB, Lumenta HB, Frey M, Kitzinger (2008) Tissue Engineering for cutaneous wounds: an overview of current standards and possibilities. *European Journal of Surgery* 40/1:19-26.

Kaur P, Li A (2000) Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol* 114:413-20.

Keller GM (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 7:862-9.

Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Brelje TC (1994) Innervation and vasculature of human sweat glands: an immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *J Neurosci* 14:6825-33.

Kim YJ, Yu JM, Joo HJ, Kim HK, Cho HH, Bae YC, *et al.* (2007) Role of CD9 in proliferation and proangiogenic action of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Pflugers Arch* 455:283-96.

Kligys KR, Wu Y, Hopkinson SB, Kaur S, Plataniias LC, Jones JC (2012) alpha6beta4 integrin, a master regulator of expression of integrins in human keratinocytes. *J Biol Chem* 287:17975-84.

Kloepper JE, Tiede S, Brinckmann J, Reinhardt DP, Meyer W, Faessler R, *et al.* (2008) Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. *Exp Dermatol* 17:592-609.

Kolar Z, Ehrmann J, Jr., Turashvili G, Bouchal J, Mokry J (2007) A novel myoepithelial/progenitor cell marker in the breast? *Virchows Arch* 450:607-9.

Koster MI, Roop DR (2004) p63 and epithelial appendage development. *Differentiation* 72:364-70.

Kremer M, Berger A (1999) Wundheilungsstörungen bei plastischen Operationen- Wundmanagement und Auswirkungen für den Verletzten. *Medizin & Praxis*:20-9.

Kremer M, Berger A (2000) Perspektiven des künstlichen Hautersatzes. *Deutsches Ärzteblatt* 97:1222-7.

Kruse C, Birth M, Rohwedel J, Assmuth K, Goepel A, Wedel T (2004a) Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics* 79:1617-24.

Kruse C, Birth M, Rohwedel J, k.Assmuth, Goepel A, Wedel T (2004b) Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics A* 79:pp 1617-24.

Kruse C, Bodo E, Petschnik AE, Danner S, Tiede S, Paus R (2006a) Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin? *Exp Dermatol* 15:794-800.

Kruse C, Kajahn J, Petschnik AE, Maass A, Klink E, Rapoport DH, *et al.* (2006b) Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat* 188:503-17.

Kurosumi K, Shibasaki S, Ito T (1984) Cytology of the secretion in mammalian sweat glands. *Int Rev Cytol* 87:253-329.

- Langbein L, Rogers MA, Praetzel S, Cribier B, Peltre B, Gassler N, *et al.* (2005) Characterization of a novel human type II epithelial keratin K1b, specifically expressed in eccrine sweat glands. *J Invest Dermatol* 125:428-44.
- Larouche D, Hayward C, Cuffley K, Germain L (2005) Keratin 19 as a stem cell marker in vivo and in vitro. *Methods Mol Biol* 289:103-10.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669-75.
- Lee PH, Kim JW, Bang OY, Ahn YH, Joo IS, Huh K (2008) Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clin Pharmacol Ther* 83:723-30.
- Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ (2009) The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood* 113:816-26.
- Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD, Watt FM (2000) beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell* 11:453-66.
- Li A, Simmons PJ, Kaur P (1998) Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3902-7.
- Li H, Cherukuri P, Li N, Cowling V, Spinella M, Cole M, *et al.* (2007) Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors. *Cancer Res* 67:501-10.
- Li H, Fu X, Ouyang Y, Cai C, Wang J, Sun T (2006) Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. *Cell Tissue Res* 326:725-36.
- Li HH, Zhou G, Fu XB, Zhang L (2009) Antigen expression of human eccrine sweat glands. *J Cutan Pathol* 36:318-24.
- Li J, Miao C, Guo W, Jia L, Zhou J, Ma B, *et al.* (2008) Enrichment of putative human epidermal stem cells based on cell size and collagen type IV adhesiveness. *Cell Res* 18:360-71.
- Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, *et al.* (2003) Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9958-61.
- Liao T, Lehmann J, Nagel S, Yay A, Zhang G, Matthiessen A, *et al.* (2012) Nestin progenitor cells isolated from adult human sweat gland stroma stimulate reepithelialisation and angiogenesis in human skin organ culture. *J Invest Dermatol*.

- Lindner U, Kramer J, Behrends J, Driller B, Wendler NO, Boehrsen F, *et al.* (2010) Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins. *Cytotherapy* 12:992-1005.
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, *et al.* (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471:68-73.
- Lu CP, Polak L, Rocha AS, Pasolli HA, Chen SC, Sharma N, *et al.* (2012) Identification of stem cell populations in sweat glands and ducts reveals roles in homeostasis and wound repair. *Cell* 150:136-50.
- Lu Z, Hasse S, Bodo E, Rose C, Funk W, Paus R (2007) Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Exp Dermatol* 16:37-44.
- Lüllmann-Rauch R (2009) *Taschenlehrbuch Histologie*, vol. 2nd. Thieme: Stuttgart, 526-50.
- Lynch L, O'Donoghue D, Dean J, O'Sullivan J, O'Farrelly C, Golden-Mason L (2006) Detection and characterization of hemopoietic stem cells in the adult human small intestine. *J Immunol* 176:5199-204.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 11:428-42.
- Martin P (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75-81.
- Matoltsy AG (1986) *The skin of mammals, dermis.*, vol. 2 Vertebrates. Springer: Berlin, 272-7.
- Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, *et al.* (2004) A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 313:503-8.
- Meng Y, Eshghi S, Li YJ, Schmidt R, Schaffer DV, Healy KE (2010) Characterization of integrin engagement during defined human embryonic stem cell culture. *FASEB J* 24:1056-65.
- Metze D, Bhardwaj R, Amann U, Eades-Perner AM, Neumaier M, Wagener C, *et al.* (1996) Glycoproteins of the carcinoembryonic antigen (CEA) family are expressed in sweat and sebaceous glands of human fetal and adult skin. *J Invest Dermatol* 106:64-9.
- Michel G, Kemeny L, Peter RU, Beetz A, Ried C, Arenberger P, *et al.* (1992) Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. *FEBS Lett* 305:241-3.

Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolar Z, *et al.* (2004) Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 13:658-64.

Mokry J, Ehrmann J, Karbanova J, Cizkova D, Soukup T, Suchanek J, *et al.* (2008) Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 51:173-9.

Moll I, Houdek P, Schmidt H, Moll R (1998) Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111:251-8.

Moll I, Moll R (1992) Changes of expression of intermediate filament proteins during ontogenesis of eccrine sweat glands. *J Invest Dermatol* 98:777-85.

Moll R, Divo M, Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129:705-33.

Moll R, Hage C, Thoenes W (1991) Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Lab Invest* 65:74-86.

Montagna W, Kligman AM, Carlisle KS (1992) *Atlas of Normal Human Skin*. Springer: New York, 226-74.

Montagna W, Parrakkal P (1974) *Apocrine glands*. , 3rd edn. Academic Press: New York, 332-65.

Navsaria HA, Ojeh NO, Moiemmen N, Griffiths MA, Frame JD (2004) Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). *Plast Reconstr Surg* 113:978-81.

Nguyen BP, Ryan MC, Gil SG, Carter WG (2000) Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12:554-62.

O'Connor (1981) Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1:75-8.

Okada N, Kitano Y, Morimoto T (1983) Isolation of a viable eccrine sweat gland by dispase. *Arch Dermatol Res* 275:130-3.

Okochi H, Kato M, Nashiro K, Yoshie O, Miyazono K, Furue M (1997) Expression of tetra-spans transmembrane family (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 and CD82) in normal and neoplastic human keratinocytes: an association of CD9 with alpha 3 beta 1 integrin. *Br J Dermatol* 137:856-63.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104:233-45.

Paquet-Fifield S, Schluter H, Li A, Aitken T, Gangatirkar P, Blashki D, *et al.* (2009) A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J Clin Invest* 119:2795-806.

Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, *et al.* (2010) Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 28:2162-71.

Petschnik AE (2011) Xenogene Kokultur zur Induktion der neuronalen Differenzierung in humanen glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen. *Dissertation Lübeck*.

Petschnik AE, Klätte JE, Evers LH, Kruse C, Paus R, Danner S (2010) Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br J Dermatol* 162:380-3.

Phillips TJ, Gilchrist BA (1992) Clinical applications of cultured epithelium. *Epithelial Cell Biol* 1:39-46.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7.

Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ (2004) Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 103:1647-52.

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:33-45.

Pontiggia L, Biedermann T, Meuli M, Widmer D, Bottcher-Haberzeth S, Schiestl C, *et al.* (2009) Markers to evaluate the quality and self-renewing potential of engineered human skin substitutes in vitro and after transplantation. *J Invest Dermatol* 129:480-90.

Porter RM, Lunny DP, Ogden PH, Morley SM, McLean WH, Evans A, *et al.* (2000) K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Lab Invest* 80:1701-10.

Providence KM, Higgins PJ (2004) PAI-1 expression is required for epithelial cell migration in two distinct phases of in vitro wound repair. *J Cell Physiol* 200:297-308.

Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WB, Leigh IM, Lane EB (1990) Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci* 97 (Pt 1):39-50.

Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R (2004) Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 36:598-606.

Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B (2002) Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2:826-35.

Rapoport DH, Schick Tanz S, Gurleyik E, Zuhlke C, Kruse C (2009) Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells. *Ann Anat* 191:446-58.

Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M (2007) A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 21:860-7.

Reichmann E (2005) Tissue Engineering: Utopie oder Realität. *Urologie und Urogynäkologie* 12:24-6.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18:399-404.

Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-43.

Rittie L, Sachs DL, Orringer JS, Voorhees JJ, Fisher GJ (2012) Eccrine Sweat Glands are Major Contributors to Reepithelialization of Human Wounds. *Am J Pathol* 182:163-71.

Robinton DA, Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481:295-305.

Rodin S, Domogatskaya A, Strom S, Hansson EM, Chien KR, Inzunza J, et al. (2010) Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol* 28:611-5.

Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C (2005) The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87:125-8.

Rohen J, Lütjen-Drecoll E (2000) *Funktionelle Histologie*, vol. 4. Schattauer: Stuttgart, 439-57.

Rohen JW, Lütjen-Drecoll E (2007) *Funktionelle Embryologie*, vol. 3. Schattauer: Stuttgart, 31-67.

Rohr F (2012) Mesodermale Differenzierung humaner adulter Stammzellen aus Schweißdrüsen. *Masterarbeit* Lübeck.

Rue LW, Cioffi WG, McManus WF, Pruitt BA, Jr. (1993) Wound closure and outcome in extensively burned patients treated with cultured autologous keratinocytes. *J Trauma* 34:662-8.

Ruetze M, Gallinat S, Wenck H, Deppert W, Knott A (2010) In situ localization of epidermal stem cells using a novel multi epitope ligand cartography approach. *Integr Biol (Camb)* 2:241-9.

Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman RD, *et al.* (2001) Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem* 276:16456-63.

Salem H, Ciba P, Rapoport DH, Egana JT, Reithmayer K, Kadry M, *et al.* (2009) The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold based skin regeneration. *Biomaterials* 30:789-96.

Sato K, Leidal R, Sato F (1987) Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *Am J Physiol* 252:R166-80.

Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I (1999) In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch Dermatol Res* 291:400-4.

Schiefferdecker P (1922) *Die Hautdrüsen des Menschen und des Säugetieres, ihre bedeutung sowie die Muscularis sexualis*, vol. 72. Zoologica, 1-154.

Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-9.

Schon M, Benwood J, O'Connell-Willstaedt T, Rheinwald JG (1999) Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. *J Cell Sci* 112 1925-36.

Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, *et al.* (2001) Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 913:201-5.

Schuleri KH, Boyle AJ, Hare JM (2007) Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handb Exp Pharmacol*:195-218.

Selleri S, Seltmann H, Gariboldi S, Shirai YF, Balsari A, Zouboulis CC, *et al.* (2006) Doxorubicin-induced alopecia is associated with sebaceous gland degeneration. *J Invest Dermatol* 126:711-20.

Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F (2007) p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 129:523-36.

Sheng Z, Fu X, Cai S, Lei Y, Sun T, Bai X, *et al.* (2009) Regeneration of functional sweat gland-like structures by transplanted differentiated bone marrow mesenchymal stem cells. *Wound Repair Regen* 17:427-35.

Sieber-Blum M, Grim M (2004) The adult hair follicle: cradle for pluripotent neural crest stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72:162-72.

Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V (2004) Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn* 231:258-69.

Sinha S, Fuchs E (2001) Identification and dissection of an enhancer controlling epithelial gene expression in skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2455-60.

Smola H, Eming SA, Hess S, Werner S, Krieg T (2001) Wundheilung und Wundheilungsstörungen. *Deutsche Ärzteblatt* 98:2802-9.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414:98-104.

Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, *et al.* (1999) A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem* 274:9881-90.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, *et al.* (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270:27348-57.

Su J, You P, Li WL, Tao XR, Zhu HY, Yao YC, *et al.* (2010) The existence of multipotent stem cells with epithelial-mesenchymal transition features in the human liver bud. *Int J Biochem Cell Biol* 42:2047-55.

Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H (2010) The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem* 58:721-30.

Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26:495-502.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-72.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102:451-61.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7.

Thomson M, Liu SJ, Zou LN, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S (2011) Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 145:875-89.

Tiede S, Kloepper JE, Ernst N, Poeggeler B, Kruse C, Paus R (2009) Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J Invest Dermatol* 129:2711-20.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, *et al.* (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3:778-84.

Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD (2005) Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23:727-37.

Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC (2012) Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell* 47:169-82.

Tucker RP (2004) Neural crest cells: a model for invasive behavior. *Int J Biochem Cell Biol* 36:173-7.

Uchugonova A, Duong J, Zhang N, Konig K, Hoffman RM (2011) The bulge area is the origin of nestin-expressing pluripotent stem cells of the hair follicle. *J Cell Biochem* 112:2046-50.

Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Rantanen J, Hurme T, Lendahl U, *et al.* (1999) Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle. *Am J Pathol* 154:591-600.

Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ (2011) Transforming Growth Factor-beta and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing. *Front Physiol* 2:89.

Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A, Ramesh T (2012) Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res* 347:419-27.

Wang N, Gibbons CH, Freeman R (2011) Novel immunohistochemical techniques using discrete signal amplification systems for human cutaneous peripheral nerve fiber imaging. *J Histochem Cytochem* 59:382-90.

Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N (2012) Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 10:440-54.

Watt FM (2002) Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21:3919-26.

Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V (2006) Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev* 16:518-24.

Weigert R, Choughri H, Casoli V (2011) Management of severe hand wounds with Integra(R) dermal regeneration template. *J Hand Surg Eur Vol* 36:185-93.

Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83:835-70.

- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, *et al.* (2004) Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61:2510-22.
- Wilke K, Wepf R, Keil FJ, Wittern KP, Wenck H, Biel SS (2006) Are sweat glands an alternate penetration pathway? Understanding the morphological complexity of the axillary sweat gland apparatus. *Skin Pharmacol Physiol* 19:38-49.
- Williamson JS, Snelling CF, Clugston P, Macdonald IB, Germann E (1995) Cultured epithelial autograft: five years of clinical experience with twenty-eight patients. *J Trauma* 39:309-19.
- Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, *et al.* (2006) Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* 175:1005-15.
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM (2005) On mammary stem cells. *J Cell Sci* 118:3585-94.
- Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE (2007) Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 15:18-26.
- Yaworsky PJ, Kappen C (1999) Heterogeneity of neural progenitor cells revealed by enhancers in the nestin gene. *Dev Biol* 205:309-21.
- Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, *et al.* (2006) Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 168:1879-88.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-20.
- Yu KR, Yang SR, Jung JW, Kim H, Ko K, Han DW, *et al.* (2012) CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells* 30:876-87.
- Zaehres H, Kim JB, Scholer HR (2010) Induced pluripotent stem cells. *Methods Enzymol* 476:309-25.
- Zaulyanov L, Kirsner RS (2007) A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clin Interv Aging* 2:93-8.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:1129-33.
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, *et al.* (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12:11-24.

Zouboulis CC (2009) Stammzellen und ihre Bedeutung in der Dermatologie. *Akt Dermatol* 35:120-8.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, *et al.* (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-95.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Embryonalentwicklung.....	2
Abbildung 2: Schichtung der Haut.	5
Abbildung 3: Schichtung der Epidermis.	6
Abbildung 4: Die Schweißdrüsen und der Haarfollikel.....	8
Abbildung 5: Aufbau der ekkrinen Schweißdrüsen.	10
Abbildung 6: Aufbau der apokrinen Schweißdrüsen.....	11
Abbildung 7: Die embryonale Haarentwicklung.	13
Abbildung 8: Der Haarzyklus.	14
Abbildung 9: Stammzellquellen der Haut.....	15
Abbildung 10: Phasen der Wundheilung.....	17
Abbildung 11: Transkriptionsfaktor-Stammzellchip.....	47
Abbildung 12: Auswertung im Punkt-Diagramm.	49
Abbildung 13: Auswertung im Histogramm.....	50
Abbildung 14: Zytokinarray	51
Abbildung 15: Immunzytochemische Fluoreszenzanalyse humaner Achselhaut.....	56
Abbildung 16: Isolationsoptimierung von Schweißdrüsen aus Rattenpfotenhaut.	57
Abbildung 17: Schweißdrüsenisolation aus humaner Achselhaut und Gewinnung einer Nestin-positiven Zellpopulation.....	59
Abbildung 18: Wachstumseigenschaften der SGSCs.....	62
Abbildung 19: Genexpressionsänderung bei der Gewinnung der SGSCs.....	64
Abbildung 20: Genexpressionsänderung der SGSCs über die Kultivierungszeit.	65
Abbildung 21: Immunzytochemischer Nachweis des spontanen Differenzierungspotentials.	67
Abbildung 22: Expression aktivierter Transkriptionsfaktoren.	68
Abbildung 23: Generierung von Zellklonen.....	69
Abbildung 24: Nestin Expression unterschiedlicher Zellpopulationen.....	71
Abbildung 25: Proteinexpressionsanalyse der SGSCs im Vergleich zu den EpiSCs und den Stammzellnischen der Achselhaut.	72
Abbildung 26: Expressionsanalyse der Oberflächenproteine der SGSCs im Vergleich zu den BMSCs.	74

Abbildung 27: Ektodermale Differenzierung mittels organotypischer 3D Zellkultivierung.	76
Abbildung 28: Induzierte Mesodermdifferenzierung der SGSCs im Vergleich zu den BMSCs.....	79
Abbildung 29: Zytokinsekretionsprofil der SGSCs.....	81
Abbildung 30: Schweißdrüsenkultivierung in 3D Kollagenmatrix.	82
Abbildung 31: Expressionsschema der untersuchten Proteine in der Haut und ihren Anhangsgebilden.	94
Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung von $\alpha 6$ und Nestin <i>in situ</i> und <i>in vitro</i>	97
Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung einer apokrinen Schweißdrüse mit Laminin und Nestin.	108

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper.	30
Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper.....	31
Tabelle 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper.	31
Tabelle 4: Verwendete Primer.	32
Tabelle 5: Schweißdrüsenisolation durch das Ablösen der Epidermis.	35
Tabelle 6: Optimierung der Kollagenase-Inkubationszeiten.....	36
Tabelle 7: Transkriptionsfaktoren des Transkriptionsfaktor-Stammzellchips und deren Funktion.....	45
Tabelle 8: Absorptions- und Emissionswellenlängen.....	48
Tabelle 9: Verwendete Spannungen.	49
Tabelle 10: Expressionsübersicht der untersuchten Proteine in der Haut und ihren Anhangsgebilden.	95

8.3 Abkürzungsverzeichnis

α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
A	apokrine Schweißdrüsen
ATMP	<i>advanced therapeutical medicinal product</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AU	<i>arbitrary units</i>
β 3T	β 3Tubulin
BMSCs	<i>bone marrow stem cells</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c/EBP β	<i>CCAAT/enhancer binding protein β</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
Col7 α	<i>collagen type VII alpha</i>
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	ekkrine Schweißdrüsen
EBs	<i>embryoid bodies</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EpiSCs	<i>epidermal stem cells</i>
ESCs	<i>embryonic stem cells</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
dsDNA	<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>
gDNA	<i>genomic deoxyribonucleic acid</i>

G	Gang
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GRO α	<i>growth-related oncogene α</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HNF	<i>hepatocyte nuclear factor</i>
HRP	<i>horseradishperoxidase</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iPS	<i>induced pluripotent stem cells</i>
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
I α 6	Integrin alpha 6
K	Keratin
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MEF2	<i>myocyte-specific enhancer factor 2</i>
MMBs	<i>micromass bodies</i>
MSCs	<i>mesenchymal stem cells</i>
MSC-GM	<i>mesenchymal stem cell growth medium</i>
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
NF	Neurofilament
NF H	Neurofilament <i>heavy chain</i>
NF L	Neurofilament <i>light chain</i>
NF M	Neurofilament <i>medium chain</i>
NLZ	Neuralleistenzellen
OBs	<i>organoid bodies</i>
Oct4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
p63	Tumorprotein 63
P	Passage
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein

PFA	Paraformaldehyd
PGP 9,5	<i>protein gene product 9.5</i>
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
RunX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
S	sezernierender Anteil der Schweißdrüsen
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Serpin E1	<i>serine proteinase inhibitor E1</i>
SGSCs	<i>sweat gland-derived stem cells</i>
SOX2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
SSC	<i>side scatter</i>
Stat3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TF-Chip	Transkriptionsfaktor-Stammzellchip
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid
UpM	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF	<i>von Willebrand factor</i>

Danksagungen

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Charli Kruse für die Möglichkeit an der Fraunhofer EMB meine Doktorarbeit in der spannenden Thematik der Stammzellen aus Schweißdrüsen anfertigen zu dürfen. Danke für die Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Ich danke Dr. Sandra Danner für die hervorragende fachliche Betreuung während der gesamten 3 Jahre meiner Doktorarbeit. Dr. Anna Emilia Matthießen möchte ich für die bedeutende Vorarbeit auf dem Gebiet der Schweißdrüsenforschung und für die persönliche Unterstützung danken.

Mein Dank gilt auch Franziska, Tanja, Miriam und Matthias für die tolle Zusammenarbeit. Ich möchte mich auch bei allen Kollegen der EMB bedanken, insbesondere bei meiner Arbeitsgruppe für das tolle Teamwork und das freundschaftliche Miteinander.

Bei den Mitarbeitern der experimentellen Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck und der Klinik rechts der Isar für Plastische Chirurgie und Handchirurgie in München möchte ich mich für die äußerst erfolgreichen Kooperationen zur Wundheilung bedanken.

Bei den Ärzten der Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck möchte ich mich für die Bereitstellung der Hautbiopsien bedanken.

Weiterhin danke ich allen Personen, die mir durch ihre Unterstützung geholfen haben, diese Arbeit anzufertigen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und Tim, die stets an mich geglaubt und mich liebevoll unterstützt haben.

Danke!