

Aus dem

Department für Anatomie Tübingen

Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie

**Charakterisierung von Keratinozyten aus humanen
Haarfollikeln für die Generierung von induziert pluripo-
tenten Stammzellen (iPSZ)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Boenke, Judith Gabriela

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Wizenmann

Tag der Disputation: 11.10.2023

Widmung

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern Kathrin und Michael, meinem Bruder Johannes und meinem Partner Gregor in unendlicher Dankbarkeit und Liebe.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Formelverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	14
1.1 Der humane Haarfollikel	16
1.1.1 Aufbau der Felderhaut	16
1.1.2 Anatomie des humanen Haarfollikels	17
1.1.3 Wachstumszyklus der humanen Haarfollikel	20
1.2 Keratinozyten	21
1.3 Keratine	22
1.4 Fragestellung der Dissertation	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Antikörper	24
2.1.1.1 Primäre Antikörper	24
2.1.1.2 Sekundäre Antikörper	24
2.1.2 Chemikalien	25
2.1.3 Kulturen, Erhaltungsmedien und Lagerungsmedien	26
2.1.4 Ergänzungsmedien	26
2.1.5 Beschichtungen	27
2.1.6 Enzyme	27
2.1.7 Blockierungsreagenzien	27
2.1.8 Zellkulturzusätze	27
2.1.9 Equipment	28
2.1.10 Plastikware, Verbrauchs- und Verwendungsgegenstände	29
2.1.11 Kits	31

2.1.12	Verwendete Produkte für die RNA-Aufbereitung, RNA-Präamplifizierung und RNA-Analyse _____	31
2.1.13	Verwendete TaqMan™ Sonden / Assays für die RNA-Analyse_	33
2.1.14	Software_____	33
2.2	Methoden_____	34
2.2.1	Ethik _____	34
2.2.2	Extraktion und Lagerung der Haarfollikel _____	34
2.2.3	Kultivierung der Haarfollikel _____	36
	2.2.3.1 Kultivierung der Haarfollikel für das Auswachsen von Keratinozyten _____	36
	2.2.3.2 Mikroskopische Untersuchung der Haarfollikel und fotografische Dokumentation während der Kultivierungsvorgangs _____	38
	2.2.3.3 Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen von Keratinozyten an den Haarfollikeln durch Zugabe von verschiedenen Zellkulturzusätzen _____	39
	2.2.3.4 Doppeldeckgläserversuche _____	40
2.2.4	Quantifizierung der morphologischen Veränderung der Haarfollikel während der Inkubation _____	43
2.2.5	Histologische Färbung der Haarfollikel _____	46
2.2.6	Immunfluoreszenzfärbung der Haarfollikel _____	47
2.2.7	RNA-Aufbereitung, Messung der RNA-Konzentration und RNA-Analyse _____	49
	2.2.7.1 Einfrieren von ausgewachsenen Keratinozyten und Haarfollikel	49
	2.2.7.2 RNA-Aufbereitung und Konzentrationsmessung _____	49
	2.2.7.3 cDNA-Synthese, Pre-Amplifikation und Fluidigm Lauf _____	50
2.2.8	Statistik_____	51
3	Ergebnisse _____	52
3.1	Morphologische Varianz der gezupften Haarfollikel _____	52
	3.1.1 Dermal sheath_____	53

3.1.2	Haarfollikel mit ausgewachsenen Zellen im Bereich der dermalen Papille	54
3.2	Morphologische Varianz der ausgewachsenen Keratinozyten	56
3.3	Anzahl der gezupften Haarfollikel und der Haarfollikel mit ausgewachsenen Keratinozyten	58
3.4	Morphologische Veränderung der Haarfollikel während der Inkubation	59
3.5	Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten aus gezupften Haarfollikeln	64
3.6	Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln	67
3.7	Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln	71
3.8	Immunfluoreszenzfärbungen (Kryostat-Schnitte) und Genexpressionsanalyse der Haarfollikel	76
3.8.1	Immunfluoreszenzfärbung der Haarfollikel in Kryostat-Schnitten	76
3.8.2	Genexpressionsanalyse der Haarfollikel	78
3.9	Immunfluoreszenzfärbungen der ausgewachsenen Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln und Genexpressionsanalyse der Keratinozyten	79
3.9.1	Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln	79
3.9.2	Genexpressionsanalyse der Keratinozyten	90
4	Diskussion	92
4.1	Charakterisierung von Haarfollikeln und ausgewachsenen Keratinozyten	92
4.1.1	Morphologie der verschiedenen Haarfollikel und deren Veränderung während der Inkubation	92
4.1.2	Morphologie der auswachsenden Keratinozyten	95
4.1.3	Auswachsen von Zellen im Bereich der dermalen Papille	97
4.1.4	Zeitdauer bis zum Auswachsen erster Keratinozyten	99
4.1.5	Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten	100
4.1.6	Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den gezupften HF	105
4.1.6.1	<i>HF-Medium ohne Zusätze – Kontrollversuch</i>	106

4.1.6.2	IGF-1 _____	107
4.1.6.3	Die TGF- β -Inhibitoren _____	108
4.1.6.4	EGF _____	111
4.1.6.5	DAPT _____	113
4.1.6.6	Ausblick _____	115
4.2	Expression von Keratinen in humanen Haarfollikeln und primär ausgewachsenen Keratinozyten _____	116
5	Zusammenfassung _____	124
6	Literaturverzeichnis _____	127
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	131
8	Danksagung _____	132
9	Anhang _____	135
9.1	Anzahl der gezupften Haarfollikel und der Haarfollikel mit auswachsenden Keratinozyten _____	135
9.2	Morphologische Veränderung der Haarfollikel während der Inkubation inkl. Negativkontrolle _____	137
9.3	Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten _____	144
9.4	Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten _____	147
9.5	Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den Haarfollikeln _____	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Felderhaut aus Epidermis, Dermis und Subcutis mit Hautanhangsgebilden (beschriftet)	16
Abbildung 2: Anatomie eines anagenen humanen Haarfollikels (HF)	18
Abbildung 3: a) Längsschnitt (5-fache Vergrößerung, Maßstab 200µm) und b) Querschnitt (40-fache Vergrößerung, Maßstab 20µm) eines humanen Haarfollikels mit Beschriftung, histologische Hämatoxylin-Eosin-Färbung.	19
Abbildung 4: Telogener und anagener Haarfollikel (HF) im Vergleich (mit Beschriftung)	21
Abbildung 5: Zupfen der Haarfollikel (HF) in der parietalen Kopfregion, umgehender Transport des gezupften HF in das Transportmedium DMEM.	35
Abbildung 6: Darstellung T25-Flask.....	36
Abbildung 7: Device Line (0,3 cm = 3 mm; 0,25 Pt.) mit Haarfollikel (HF).....	38
Abbildung 8: 24 Well-Platte.....	40
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Wells aus den Doppeldeckglasversuchen	41
Abbildung 10: Darstellung des Eindecklungsvorgangs der immunhistochemisch gefärbten Haarfollikel (HF) inkl. Keratinozyten aus den Doppeldeckgläserversuchen..	43
Abbildung 11: Device zur Beurteilung der morphologischen Veränderung der Haarfollikel	44
Abbildung 12: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF).....	45
Abbildung 13: Beispielbild Objektträger mit HF längs (je 3 pro Präparat) umrandet mit hydrophobem PAP-Pen	47
Abbildung 14: Morphologische Varianz der gezupften Haarfollikel (HF) im Hinblick auf den Wachstumszyklus	52
Abbildung 15: Bilder unterschiedlicher anagener Haarfollikel (HF) mit großer anatomisch-morphologischer Verschiedenheit/Varianz.....	53
Abbildung 16: Haarfollikel (beschriftet) inklusive intakter dermal sheath	54
Abbildung 17: Haarfollikel mit ausgewachsenen Zellen im Bereich der dermalen Papille	55
Abbildung 18: Keratinozyten fotografiert (nach 192h Inkubation mit HF-Medium + Keratinozyten-Medium) mit ihrer unterschiedlichen Morphologie.....	56
Abbildung 19: Diagramm mit der Anzahl der inkubierten Haarfollikel (HF) n= 330	58

Abbildung 20: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF) während der Inkubation	59
Abbildung 21: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF) – Median-Werte alle Spender (S1, S2, S3 u. S4) zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (Anzahl der Versuchsreihen n= 4).....	61
Abbildung 22: Abbildung zur Verdeutlichung der nicht vorhandenen morphologischen Veränderung der Haarfollikel (HF) während der Inkubation mit Ampuwa® über 96 h ..	62
Abbildung 23: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF) der Spender S1, S2, S3, S4 bei Inkubation mit Ampuwa® als Negativkontrolle (Anzahl der Versuchsreihen n= 1).....	63
Abbildung 24: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Standardbedingungen (HF-Medium) – alle Versuchsreihen	65
Abbildung 25: Zeit in Stunden bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten	66
Abbildung 26: Verwendetes Device zur Bestimmung des Ortes, an dem die ersten Keratinozyten an den inkubierten Haarfollikeln auswachsen.....	67
Abbildung 27: Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten in Bezug auf das Device – prozentualer Anteil u. Anzahl der Haarfollikel (HF); n= Anzahl der HF	68
Abbildung 28: Haarfollikel nach 24 h Inkubation unter Normalbedingungen; Keratinozyten-Wachstum im Bereich des 2.Teils des Device.....	69
Abbildung 29: Haarfollikel nach 96 h Inkubation; Keratinozyten- Wachstum im Bereich des 3.Teils des Device	70
Abbildung 30: Gesamt-Median-Werte aller Spender im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze und der MEF-Kontrollgruppe zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten + SEM (Standard Error of the Mean).....	72
Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung eines Haarfollikels (HF) von Spender S5 mit Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)	76
Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung eines Haarfollikels (HF) von Spender S5 mit Keratin 14 (rot) und DAPI (blau).....	77
Abbildung 33: Relative Genexpression der Keratine (K 5, 10, 14, 19) in den Haarfollikeln (HF) von Spender S5 normalisiert auf GAPDH – relative Quantifizierung (Anzahl der Proben n=3)	78
Abbildung 34: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 5 (grün), Keratin 15 (rot) und DAPI (blau)	80

Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 6 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau).....	81
Abbildung 36: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 6/75 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau).....	82
Abbildung 37: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 17 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)	83
Abbildung 38: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 1 (grün), Keratin 14 (rot) und DAPI (blau)	84
Abbildung 39: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 16 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)	85
Abbildung 40: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 19 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)	86
Abbildung 41: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 25 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)	87
Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 5 (grün), Keratin 10 (rot) und DAPI (blau) in a) 10- und b) 20-facher Vergrößerung	88
Abbildung 43: Relative Genexpression der Keratine (K 5, 10, 14 u. 19) in den Keratinozyten von Spender S3 normalisiert auf GAPDH – relative Quantifizierung (n=1)	90
Abbildung 44: Relative Genexpression der Keratine (K 5, 10, 14 u. 19) in den Keratinozyten von Spender S4 normalisiert auf GAPDH – relative Quantifizierung (n=1)	91
Abbildung 45: Haarfollikel des Spenders S3 nach 48h Inkubation unter Standard-Bedingungen; Keratinozyten- Wachstum im Bereich des 1.Teils des Device	102
Abbildung 46: Haarfollikel des Spenders S1 nach 72h Inkubation unter Standard-Bedingungen; Keratinozyten- Wachstum im Bereich des 3.Teils des Device	103
Abbildung 47: Wirkung von IGF-1 über den IGF-1 Rezeptor auf den IGF-1 Signalweg	107
Abbildung 48: Verdeutlichung der Wirkung von SB431542 als TGF- β Rezeptorkinase Inhibitor	109
Abbildung 49: Wirkung des TGF β -Rezeptor-Inhibitors A83-01	110
Abbildung 50: Wirkung von EGF über den EGF-Rezeptor auf den EGF-Signalweg	112
Abbildung 51: Notch-Signalweg.....	113

Abbildung 52: Anzahl der kultivierten HF insgesamt, der HF mit ausgewachsenen Keratinozyten und der HF, die nach 96h Inkubation abgeschwommen sind mit MEF-Grundmedium, mit Ampuwa® und mit Zellkulturzusätzen zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten.....	136
Abbildung 53: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) - Spender 1	137
Abbildung 54: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) - Spender 2	138
Abbildung 55: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) – Spender 3	138
Abbildung 56: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) - Spender 4	139
Abbildung 57: Morphologische Veränderung der HF aller Spender (Spender S1, S2, S3, S4).....	142
Abbildung 58: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den Haarfollikel (HF) - alle Spender (Spender S1, S2, S3, S4) inkl. Gesamt Median-Wert	144
Abbildung 59: Zeit in Stunden bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Normalbedingungen - männliche Spender (S1 u. S4) inkl. Median-Wert.....	145
Abbildung 60: Zeit in Stunden bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Normalbedingungen - weibliche Spender (S2 u. S3) inkl. Median-Wert	145
Abbildung 61: Median-Werte Spender S1 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten	149
Abbildung 62: Median-Werte Spender S2 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten	149
Abbildung 63: Median-Werte Spender S3 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten	150
Abbildung 64: Median-Werte Spender S4 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten	150

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel für die relative Quantifizierung der RNA Daten mit Hilfe von GAPDH als Referenzgen.....	50
---	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis.....	11
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten primären Antikörper	24
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper	24
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien	25
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kulturen, Erhaltungsmedien und Lagerungsmedien	26
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Ergänzungsmedien	26
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Beschichtungen	27
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Enzyme	27
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Blockierungsreagenzien	27
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Zellkulturzusätze	27
Tabelle 11: Auflistung des verwendeten Equipments	28
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Plastikwaren, Verbrauchs- und Verwendungsgegenstände.....	29
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Kits	31
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Produkte für die RNA-Aufbereitung, RNA-Präamplifizierung und RNA-Analyse.....	31
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten TaqMan™ Sonden / Assays für die RNA-Analyse.....	33
Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Softwares	33
Tabelle 17: Auflistung der Bestandteile und der Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.....	37
Tabelle 18: Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der Keratinozyten an den HF mit Endkonzentration im Grundmedium	39
Tabelle 19: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Verwendung des Standardprotokolls.....	64

Tabelle 20: Zellkulturzusätze mit Endkonzentrationen, die verwendet wurden, in der Versuchsreihe: Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten.....	71
Tabelle 21: Auflistung der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Keratine (absteigend nach ihrem Molekulargewicht in kDa) und deren Expressierung in den Haarfollikeln (HF) des Spenders S5	77
Tabelle 22: Auflistung der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Keratine (sortiert nach absteigendem Molekulargewicht in kDa) und deren Expressierung in den ersten auswachsenden Keratinozyten an den in den DDG inkubierten Haarfollikeln (HF) mit Keratinozyten.....	89
Tabelle 23: Durchgeführte Versuche (verschiedene Medien und Zellkulturzusätze) und die Erfolgsquote hinsichtlich des Auswachsens der Keratinozyten	106
Tabelle 24: Zusammenfassung Expression der Keratine (K) in humanen Haarfollikeln (HF) und den primär auswachsenden Keratinozyten	116
Tabelle 25: Tabelle mit der Anzahl der inkubierten HF, Anzahl der HF mit ausgewachsenen Keratinozyten inkl. Prozentsatz, Anzahl der nach 96h abgeschwommenen HF inkl. Prozentsatz.....	135
Tabelle 26: Absolute, gemessene Werte (in mm) und relative Werte der morphologischen Veränderung der HF während der Inkubation der Spender S1 und S2	140
Tabelle 27: Absolute, gemessene Werte (in mm) und relative Werte der morphologischen Veränderung der HF während der Inkubation der Spender S3 und S4	141
Tabelle 28: Absolute, gemessene Werte (in mm) und relative Werte der Negativkontrolle der morphologischen Veränderung der HF während der Inkubation mit Ampuwa® der Spender S1, S2, S3 und S4	142
Tabelle 29: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Normalbedingungen - alle Spender, inkl. Medianwert	146
Tabelle 30: Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten an den inkubierten HF unter Normalbedingungen in Bezug auf das Device	147
Tabelle 31: Zeitpunkte, an denen erste Keratinozyten ausgewachsen sind bei Zugabe der verschiedenen Zellkulturzusätze und der MEF-Kontrollgruppe inkl. Median-Werte	148

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
∅	Durchmesser
(q)RT-PCR	(quantitative) real-time Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	anti
A83-01	3-(6-Methyl-2-pyridinyl)-N-phenyl-4-(4-quinolinyl)-1H-pyrazole-1-carbothioamide = TGF-β type I-Inhibitor
AA	Antibiotic Antimycotic
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Störung mit Hyperaktivität
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calcium-Chlorid
Cat. No.	Catalogue Number
C _E	Endkonzentration
CK	Cytokeratin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Donkey
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPT	24-diamino-5-phenylthiazole = γ-secretase inhibitor (Notch-Inhibitor)
DK-SFM	Defined animal origin-free Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
et al.	und andere
FCS, FBS	Fetales Kälber Serum
FGF2	Fibroblast-Growth-Factor 2
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gt	goat

h	Stunde(n)
HE-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HF	Haarfollikel
HKGS	Human keratinocyte growth supplement
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
inkl.	inklusive
iPSZ	induziert pluripotente Stammzellen
K	Keratin
kDa	Kilodalton
KGM2	Serum-free Keratinocyte growth medium 2
KRT	Keratin
M.	Musculus
MAP	Mitogen-activated protein
MEF-Medium	Mouse-Embryonic-Fibroblast-Medium
min./Min.	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP-Lösung	Magermilchpulver-Blockierlösung
ms	Mouse
NDS	Normal Donkey Serum
ng	Nanogramm
o.	oder
O ₂	Sauerstoff
PBS ^{-/-}	Phosphate Buffered Saline (=Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
Pt.	Punkt
RAS	Rat Sarcoma
rb	rabbit
RNA	Ribonucleinsäure
Rock-I	Rock-Inhibitor
rpm	revolutions per minute
s.	siehe
s.o.	siehe oben

SB431542	4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl]benzamide = TGF- β receptor kinase inhibitor
SCARA5	Scavenger Receptor Class A Member 5
Sek.	Sekunden
SEM	Standard error of the mean (= Standardfehler des Median-Werts)
Spender 1	S1
Spender 2	S2
Spender 3	S3
Spender 4	S4
Spender 5	S5
u.	und
V _A	Ausgangsvolumen
V _E	Endvolumen
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
β MeETOH	Beta-Mercaptoethanol
μ	Mikro
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Doktorarbeit das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

1 Einleitung

Der Einsatz induziert pluripotenter Stammzellen (iPSZ) zeigt sowohl in der molekularbiologischen Forschung als auch in der Medizin ein sehr hohes Potential. Die in den Laboren gewonnenen induziert pluripotenten Stammzellen werden unter anderem zur Modellierung von Krankheitsmodellen wie ADHS (Re et al., 2018) oder degenerativen Erkrankungen der Retina (Seitz et al., 2016) genutzt und ermöglichen dabei ein grundlegendes und besseres Verständnis der jeweiligen Erkrankung. Diese Forschungsansätze ermöglichen auch die Erprobung von Therapieansätzen für zahlreiche Erkrankungen. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von iPSZ in der Grundlagenforschung ist die Reduzierung von Tierversuchen (Wustner et al., 2022).

Der Grundstein zur Nutzung von iPSZ wurde im Jahr 2006 gelegt. Die Arbeitsgruppen um Kazutoshi Takahashi und Shinya Yamanaka konnten zeigen, dass Zellen, beispielsweise Hautfibroblasten, in iPSZ umgewandelt (reprogrammiert) werden können (Takahashi and Yamanaka, 2006). Mit Hilfe der forcierten Überexpression von bestimmten Transkriptionsfaktoren gelangen diese Zellen zurück in ihren embryonalen Stammzellenzustand und können anschließend bei Bedarf in nahezu alle Zellen des menschlichen Körpers differenziert werden (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Für die Generierung der iPSZ braucht es somatische Zellen als Ausgangsmaterial. Dafür werden hauptsächlich die in der Erstbeschreibung verwendeten Fibroblasten genutzt. Aber auch T-Zellen aus dem Blut, epitheliale Zellen aus dem Urin oder Keratinozyten können als reife Ausgangszellen eingesetzt werden (Raab et al., 2014). Es können darüber hinaus ungewöhnlichere Quellen zur Gewinnung der iPSZ genutzt werden, wie beispielsweise Zellen aus extrahierten Weisheitszähnen und Milchzähnen, Blut aus der Nabelschnur und post-mitotische primäre Neurone (Klingenstein et al., 2020). Diese ungewöhnlichen humanen Zellquellen, die für die Gewinnung der iPSZ genutzt werden, sind jedoch sehr limitiert und die dafür erforderlichen Methoden sind technisch sehr anspruchsvoll.

Deshalb sind Hautfibroblasten die häufigste verwendete somatische Zellquelle zur Generierung von iPSZ. Um diese von Patienten oder Kontrollpersonen zu

gewinnen, müssen jedoch Hautbiopsien invasiv entnommen werden. Diese Methode kann nur von medizinisch ausgebildetem Personal unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Nötig hierfür ist eine kleine Operation, welche mit Anästhesie, Schmerzbehandlung und Vernähen verbunden ist (Normand and Karasek, 1995). Als Risiken und Nebenwirkungen können bei solch einem Eingriff kleine Nachblutungen, Infektionen, allergische Reaktionen auf das Anästhetikum und die Bildung von Narbengewebe die Folge sein (Raab et al., 2014).

Eine mögliche Alternative zu Hautfibroblasten als somatische Zellquelle für die weiterführende Reprogrammierung zu iPSZ stellen Keratinozyten aus Haarfollikeln (HF) dar. Für die Kultivierung der Keratinozyten aus extrahierten humanen HF werden die HF lediglich unter Verwendung von sterilen Handschuhen von der parietalen Kopfregeion der Patienten mit Hilfe einer sterilen anatomischen Pinzette gezupft. Dieses Verfahren zur Gewinnung der HF ist somit nicht-invasiv, schmerzfrei und die Entnahme ist beinahe überall, auch ohne medizinisches Personal, durchführbar (Raab et al., 2014). Ein weiterer Vorteil ist, dass beinahe alle Patienten, unabhängig von Geschlecht oder Alter, als mögliche Spender von HF in Frage kommen (Wustner et al., 2022). Ein zusätzlicher Vorteil von Keratinozyten gegenüber von mesenchymalen Fibroblasten aus Hautbiopsien liegt in der Reprogrammierungseffizienz, die bei Keratinozyten etwa hundert Mal höher ist im Vergleich zu Fibroblasten (Aasen et al., 2008).

Im Rahmen dieser Dissertation soll die Methodik der Gewinnung von ektodermalen Keratinozyten aus gezupften humanen Kopfharen detailliert untersucht werden. Diese Keratinozyten können im späteren Verlauf für die Generierung von iPSZ genutzt werden. Im Detail soll dabei die Charakterisierung der HF selbst und auch der auswachsenden Keratinozyten erfolgen. Es sollen die Keratinozyten genauestens untersucht werden, die als erstes aus den HF auswachsen hinsichtlich der Expression verschiedener Keratine. Hierbei ist vor allem wichtig, statistische Daten darüber zu sammeln, in welchem Bereich des HFs die ersten Keratinozyten auswachsen und in welchem Zeitrahmen dies geschieht. Ebenfalls wird analysiert, ob das Auswachsen der Keratinozyten an den HF durch die Zugabe verschiedener kleiner Moleküle und Wachstumsfaktoren im Rahmen von Zellkulturzusätzen beeinflusst werden kann.

1.1 Der humane Haarfollikel

Haare sind ein wesentliches Merkmal von Säugetieren und dienen unter anderem der Thermoregulation, dem Schutz, der Verteilung von Schweiß und Talg, der Sensorik und auch der sozialen Interaktion der Individuen (Schneider et al., 2009). Beim Menschen wird die Haut in zwei Bereiche unterteilt: in die Leistenhaut, welche unbehaart ist und sich an den Hand- und Fußflächen findet, und in die Felderhaut (siehe **Abbildung 1**), die den Großteil des menschlichen Körpers bedeckt und behaart ist (Tagami, 2008).

1.1.1 Aufbau der Felderhaut

Die Haut des Menschen stellt das größte Organ dar und besteht von apikal nach basal aus der Epidermis, der Dermis und der Subcutis (Schneider et al., 2009, Grice and Segre, 2011). Die Epidermis besteht wiederum aus verschiedenen Schichten (von apikal nach basal): 1 Stratum corneum, 2 Stratum granulosum, 3 Stratum spinosum und 4 Stratum basale (Baroni et al., 2012), siehe **Abbildung 1**.

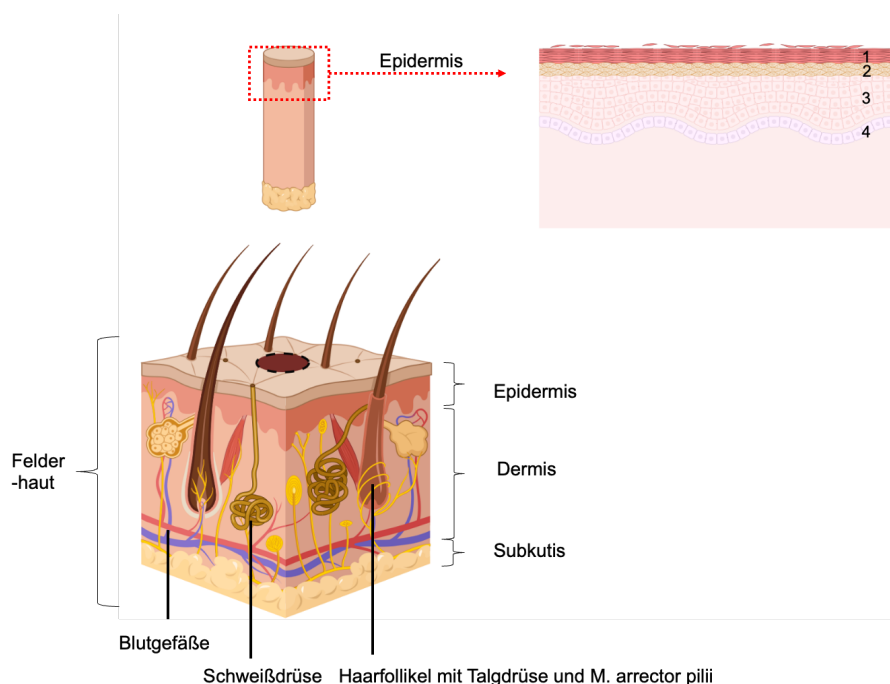


Abbildung 1: Aufbau der Felderhaut aus Epidermis, Dermis und Subcutis mit Hautanhangsgebilden (beschriftet). Roter gepunkteter Kasten zeigt die Vergrößerung der Epidermis rechts, die aus verschiedenen Schichten besteht (1: Stratum corneum, 2: Stratum granulosum, 3: Stratum spinosum und 4: Stratum basale); Abbildung entworfen mit BioRender.com; Beschriftung frei nach Schneider et al. und Grice und Segre (Schneider et al., 2009, Grice und Segre, 2011)

Die Hauptmasse der Zellen der Epidermis stellen die Keratinozyten (siehe **1.2**) dar, zusätzlich finden sich Melanozyten, die für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind, sowie Langerhanszellen und Merkelzellen, welche mechanische Stimuli der Haut aufnehmen (Fore, 2006). Zudem finden sich in der Epidermis Hautanhangsgebilde wie die Schweißdrüsen, die Talgdrüsen und auch die HF (siehe **1.1**) (Fore, 2006). Die Dermis enthält die Blutgefäße und ist somit verantwortlich für die Nährstoffversorgung der Epidermis und des HF (Fore, 2006).

1.1.2 Anatomie des humanen Haarfollikels

In der Felderhaut sind die HF tief in die Dermis eingebettet. Dort sind die HF mit Talgdrüsen, apokrinen Drüsen und dem Musculus arrector pili assoziiert (Schneider et al., 2009), welcher für die Piloerektion (Driskell et al., 2013) der Haare in der Dermis verantwortlich ist (siehe **Abbildung 2**).

Der humane HF kann in seiner Längsachse in verschiedene Sektionen unterteilt werden. Am weitesten distal gelegen findet sich das Infundibulum, welches den Haarkanal nach außen hin öffnet und die Verbindung zum Isthmus herstellt. Diese beiden Anteile gehören zum oberen Follikel (siehe **Abbildung 2**). Weiter proximal schließt sich an den Isthmus die suprabulbäre Region an, die in der Haarzwiebel mündet (Schneider et al., 2009). Im distalen Bereich des Isthmus zeigt sich eine Ausbuchtung des HF, welche mit der Insertion des Musculus arrector pili assoziiert ist (siehe **Abbildung 2**). Diese Ausbuchtung enthält epidermale Stammzellen (Stammzellnische), die ein Teil der äußeren Wurzelscheide sind (Martel et al., 2022). Zusätzlich zeigt sich bei der genauen Betrachtung des proximalen Endes der HF die dermale Papille, die ein Teil der Haarzwiebel ist, aus spezialisierten, mesenchymalen Zellen besteht und eine wichtige Rolle in der Regulation der HF-Stammzellen, der Proliferation und Differenzierung während des Haarzyklus spielt (Martino et al., 2021). Zusammen bilden all diese Teile den unteren Follikel, der in die Subcutis der Haut eingebettet ist (siehe **Abbildung 2**).

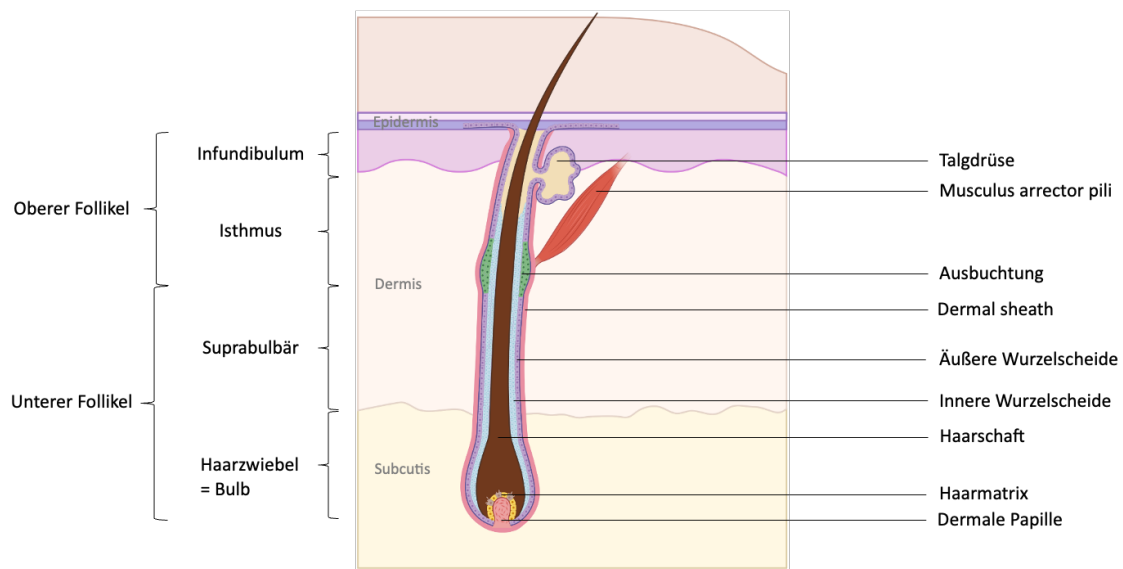


Abbildung 2: Anatomie eines anagenen humanen Haarfollikels (HF)

Schematische Beschreibung eines in die Haut eingebetteten humanen HFs in seiner Längsachse. Abbildung entworfen mit BioRender.com, Beschriftung frei nach Schneider et al. (Schneider et al., 2009)

Der HF selbst ist in verschiedene Schichten aufgeteilt: Zentral liegt der Haarschaft, welcher aus abgestorbenen Keratinozyten besteht. Diesem schließt sich die innere Wurzelscheide an, die von innen nach außen aus der Kutikula, der Huxley-Schicht und der Henle-Schicht besteht. Auf diese folgt die Begleitschicht, öfters in der Literatur auch als Companion Layer bezeichnet, welche die innere von der äußeren Wurzelscheide abgrenzt (Schneider et al., 2009). Es schließt sich der inneren Wurzelscheide nach außen die äußere Wurzelscheide an, welche wiederum aus einer äußeren und einer inneren Schicht besteht (Schneider et al., 2009). Diese unterschiedlichen Schichtungen des HF lassen sich am deutlichsten in einer histologischen Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) im Querschnitt erkennen (siehe **Abbildung 3 b**).

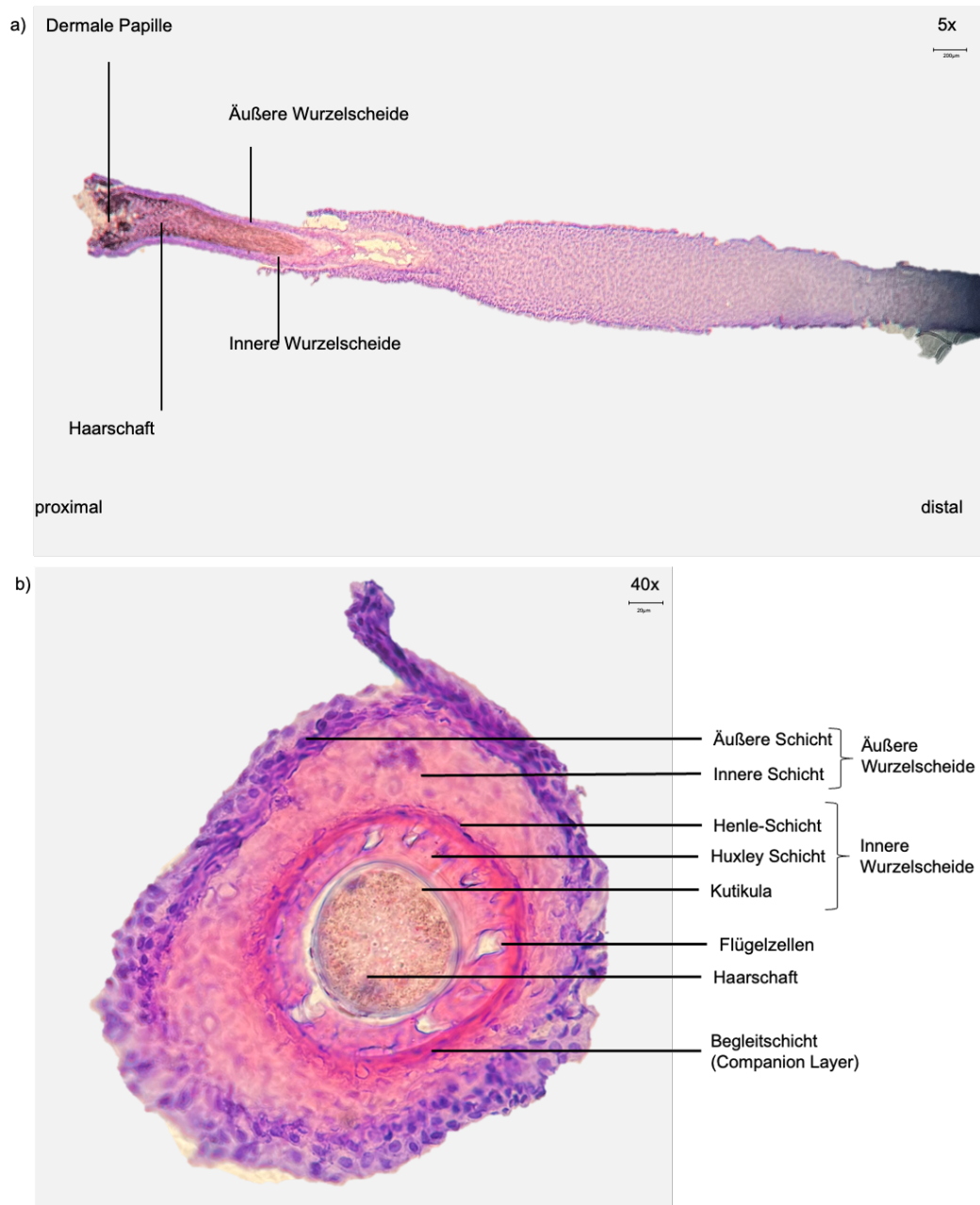


Abbildung 3: a) Längsschnitt (5-fache Vergrößerung, Maßstab 200µm) und b) Querschnitt (40-fache Vergrößerung, Maßstab 20µm) eines humanen Haarfollikels mit Beschriftung, histologische Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Aufgenommen mit Zeiss Axiostar Durchlichtmikroskop; Beschriftung frei nach Schneider et al. (Schneider et al., 2009)

An die äußere Wurzelscheide schließt sich die *dermal sheath* (siehe **Abbildung 2**) an (Schneider et al., 2009). Für die *dermal sheath* gibt es derzeit keine suffiziente lateinische oder deutsche Schreibweise, daher wird in der Dissertation weiterhin der englische Begriff verwendet. In einigen Lehrbüchern wird die *dermal sheath* als bindegewebige Wurzelscheide beschrieben. Diese Beschreibung ist

allerdings sehr allgemein und beschreibt zum Teil das komplette Bindegewebe, welches den HF umgibt und nicht nur die innerste Schicht, die der äußeren Wurzelscheide komplett anliegt. Die genaue Funktion der *dermal sheath* beim Menschen ist noch nicht vollständig erforscht (Heitman et al., 2020).

1.1.3 Wachstumszyklus der humanen Haarfollikel

Die Entwicklung der HF ist ein Zusammenspiel aus dem ektodermalen und mesodermalen Keimblatt. Aus den ektodermalen Stammzellanteilen entstehen alle epithelialen Anteile des HFs sowie die Talg- und Schweißdrüsen. Die mesodermalen Stammzellanteile entwickeln sich im Verlauf zur dermalen Papille und zur bindegewebigen Hülle um den HF. Des Weiteren beeinflussen die von der Neuralleiste abgeleiteten Melanozyten die Pigmentierung der HF (Schneider et al., 2009).

Die HF unterliegen einem autonomen Zyklus, in dem sie verschiedene Stadien der Entwicklung durchlaufen. Hierbei grenzt man die anagene Phase, in der das Wachstum stattfindet, von der katagenen Phase, die durch eine Apoptose regulierte Regression gekennzeichnet ist, von der telogenen, der Ruhephase ab (Schneider et al., 2009, Thom, 2016, Oh et al., 2016).

HF durchlaufen diese verschiedenen Wachstumsphasen und verändern sich dabei deutlich hinsichtlich ihrer Morphologie: In der anagenen Wachstumsphase, welche beim menschlichen HF bis zu sechs Jahre andauern kann, findet eine extreme Proliferation im Bereich der Haarzwiebel und eine starke Differenzierung im Bereich des Haarschafts und der inneren Wurzelscheide statt. Des Weiteren wird der Haarschaft im Verlauf dieser Wachstumsphase durch die Aktivität der Melanozyten pigmentiert (Langan et al., 2015, Alonso and Fuchs, 2006, Schneider et al., 2009). Bei HF der anagenen Phase kann die äußere und innere Wurzelscheide mikroskopisch gut voneinander unterschieden werden (siehe **Abbildung 4 b**) (Raab et al., 2014). Auf die anagene Phase folgt die regressive katagene Phase, die durch Apoptose gekennzeichnet ist. Hierbei kommt die Differenzierung zum Erliegen. Nachfolgend trifft der HF in seine telogene Ruhephase ein, in welcher er seine geringste Größe erreicht hat. In dieser Phase zeigt sich keinerlei Proliferation, Apoptose oder Differenzierung (Langan et al., 2015,

Alonso and Fuchs, 2006). Haare der telogenen Phase zeigen keine differenzierbare äußere oder innere Wurzelscheide (siehe **Abbildung 4 a**) (Raab et al., 2014).

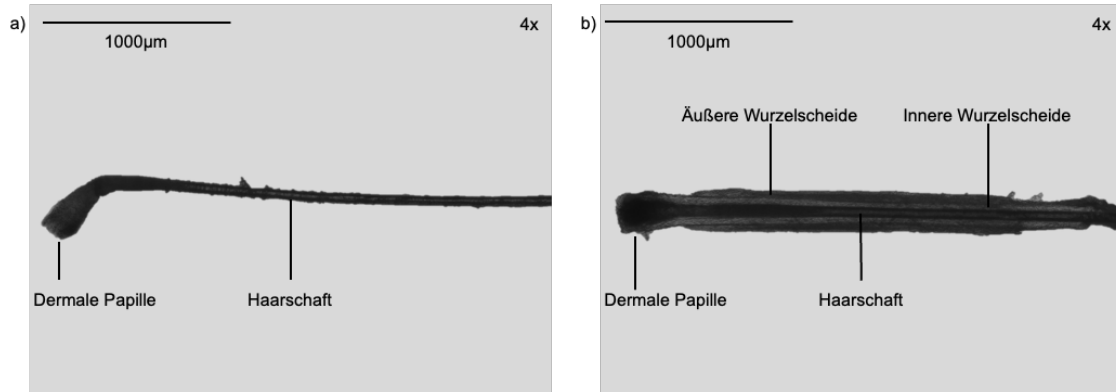


Abbildung 4: Telogener und anagener Haarfollikel (HF) im Vergleich (mit Beschriftung)

a) Telogener HF mit dermaler Papille und Haarschaft, ohne sichtbare äußere und innere Wurzelscheide

b) Anagener HF mit dermaler Papille, Haarschaft sowie sichtbarer äußerer und innerer Wurzelscheide

Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000µm

1.2 Keratinozyten

Keratinozyten finden sich nicht nur in der Haut, wo sie hauptsächlich an der Ausbildung des mehrschichtigen verhornten Plattenepithels beteiligt sind und durch ihre biomechanischen und physikalischen Eigenschaften eine Barrierschicht unserer Haut gegenüber der Umwelt bilden, sondern auch in den Hautanhangsgebilden, wie in den Haaren und Fingernägeln (Aasen and Izpisua Belmonte, 2010, Schneider et al., 2009, Prost-Squarcioni, 2006).

In den HF leiten sich die Keratinozyten in der frühen anagenen Phase überwiegend von den Matrixzellen der Haarzwiebel ab, wobei sie im späteren Verlauf der anagenen Wachstumsphase jedoch hauptsächlich von den peripheren Zellen der äußeren Wurzelscheide produziert werden (Detmar et al., 1993). So umgeben die Zellen der äußeren Wurzelscheide den HF als eine Art „geschichtetes Epithel“ und sorgen somit auch für einen engen Zusammenhang zwischen den HF und dem Epithel der Haut, in welches sie eingebettet sind (Aasen and Izpisua

Belmonte, 2010). Diese Zellen sind dadurch auch hauptverantwortlich für die Regulation des Wachstumszyklus' der Haare (siehe **1.1.3.**).

1.3 Keratine

Die Keratine (alte Bezeichnung: Cytokeratine) gehören zu der Familie der intermediärfilament-bildenden Proteine der Epithelzellen und sorgen für die mechanische Stabilität von Zellen. Sie sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Gewebestruktur und der physiologischen Funktion der Zellen (Schweizer et al., 2006).

Die Keratin-Familie besteht aus insgesamt 54 Proteinen und kann in zwei Untergruppen unterteilt werden: Typ I die sauren Keratine und Typ II die basischen oder neutralen Keratine, die jeweils in einer anderen definierten Sequenz während der Differenzierung exprimiert werden (Haines and Lane, 2012). Zusätzlich zu dieser Einteilung können die Keratine auch in verschiedene „funktionelle“ Gruppen unterteilt werden (Haines and Lane, 2012):

- Einfache Keratine
 - o Embryonales und einschichtiges Epithel
 - o Bsp.: Leber, Darm, sekretorische Drüsen
- Barriere-Keratine
 - o Mehrschichtiges Plattenepithel
 - o Bsp.: Epidermis
- Härtere Struktur-Keratine
 - o Hautanhangsgebilde
 - o Bsp.: Haare, Nägel

Mutationen der Keratine in der Haut können zu diversen Krankheiten führen, wie der Epidermolytischen Hyperkeratose (Mutation K10, K1), Epidermolysis bullosa simplex (Mutation K14, K5) oder der weißen Schleimhaut-Neavus (Mutation K13, K4) (Haines and Lane, 2012). Auch Mutationen der Keratine im HF können verschiedenste Krankheiten verursachen, wie die Entstehung von Zysten bei Mutation der Keratine K6b und K17 sowie die Entstehung von Alopezie oder Monilethrix bei Mutation der Keratine K75, K81, K83 oder K86 (Haines and Lane, 2012).

1.4 Fragestellung der Dissertation

Im Rahmen dieser Dissertation sollen mehrere Fragestellungen in dem Prozess der Generierung von iPSZ aus gezupften humanen HF detailliert untersucht werden.

Dazu gehören:

Eine detaillierte Analyse der HF selbst und denen an ihnen auswachsenden Keratinozyten vor allem in Hinblick auf ...

- ... die Anzahl der HF mit ausgewachsenen Keratinozyten
- ... den Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten an den HF
- ... den Zeitpunkt des Auswachsens der ersten Keratinozyten an den HF
- ... die Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der Keratinozyten an den HF durch Zugabe verschiedener Zellkulturzusätze
- ... die Expression verschiedenster Keratin-Marker in den HF
- .. die Expression verschiedener Keratin-Marker in den auswachsenden Keratinozyten
- .. die Zuordnung der ersten auswachsenden Keratinozyten zu einer bestimmten Schicht des HF

Diese Arbeit ist für die zukünftige Forschung insofern bedeutsam, dass hierdurch die Gewinnung der iPSZ aus den Keratinozyten, die an den HF ausgewachsen sind, vereinfacht und beschleunigt werden kann und somit eine Quelle an pluripotenten Stammzellen geschaffen werden kann, welche für die Erforschung von Krankheiten und die Therapie dieser von immenser Bedeutung ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

2.1.1.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten primären Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Anbieter</i>	<i>Cat. No.</i>	<i>Verdünnung</i>
K1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	MA1-35367	1:100
K10	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-23877	1:100
K14	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	MA5-11599	1:100
K15	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-47697	1:100
K16	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-53255	1:100
K17	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-393002	1:100
K19	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-376126	1:100
K25	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-398320	1:100
K5	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA	905501	1:200
K6	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-514520	1:100
K6/75	Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	Sc-166074	1:100

2.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Anbieter</i>	<i>Cat. No.</i>	<i>Verdünnung</i>
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	D9542	1:1000

Donkey anti-goat IgG Alexa Fluor™ 488	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	A32814	1:1000
Donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor™ 488	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	A32766	1:1000
Donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor™ 546	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	A10036	1:1000
Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor™ 488	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	A32790	1:1000
Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor™ 546	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	A10040	1:1000

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma	Cat. No.
Buffer RLT, Lysis Buffer 45ml	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	169024583
Destilliertes Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3478.2
DPX neu	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.00579.0500
Eosin G-Lösung 1% wässrig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3137.2
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K928.5
Mayers Hämalaunlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1.09249.2500
Mowiol® mounting medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	0713.2
Paraformaldehyd (PFA) Lösung 4% in Ethanol	Chem Cruz™ – Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA, USA	SC-281692
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	9036-19-5
Xylenes (Xylol)	Honeywell, Charlotte, North Carolina, USA	534056-4L
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	M6250

2.1.3 Kulturen, Erhaltungsmedien und Lagerungsmedien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kulturen, Erhaltungsmedien und Lagerungsmedien

Medium	Firma	Cat. No.
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland	40676.00.00
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high Glucose)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	41966-029
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS = PBS ^{-/-}) = Phosphatgepufferte Salzlösung	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	14190-094
Epilife®	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	M-EPI-500-CA
Fetales Kälber-Serum (Fetal bovine Serum)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	10500-064

2.1.4 Ergänzungsmedien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Ergänzungsmedien

Ergänzungsmedium	Firma	Cat. No.
Antibiotic-antimycotic 100x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	15240-062
GlutaMAX™ 100x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	35050-038
Human keratinocyte growth supplement (HKGS) 100x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	S-001-5
Human recombinant FGF-2	Cell Guidance Systems, Cambridge, UK	GFH146-50
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	111140-050
Y-27632 2HCl (Y27632)	Selleck Chem LLC, Houston, TX, USA	S1049

2.1.5 Beschichtungen

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Beschichtungen

Beschichtung	Firma	Cat. No.
Matrigel®	Corning, NY, USA	354234

2.1.6 Enzyme

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Enzyme

Enzym	Firma	Cat. No.
Dispase in Hanks' Balanced Salt Solution, 5U/ml	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada	07913

2.1.7 Blockierungsreagenzien

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Blockierungsreagenzien

Blockierungsreagenz	Firma	Cat. No.
Magermilchpuffer (MMP) aus: - 10 % NDS 1,25 % BSA 4% Magermilchpulver 0,1% Triton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	T145.5

2.1.8 Zellkulturzusätze

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Zellkulturzusätze

Zellkulturzusatz	Firma	Cat. No.	Verdünnung
A83-01	Merck Millipore (MilliporeSigma) Corp. Burlington, Massachusetts, USA	616454-2MG	1:1000
DAPT	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada	72082	1:1000
EGF	PeproTech®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	100-47	1:100
IGF-1	PeproTech®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	100-11	1:500
SB431542	Merck Millipore (MilliporeSigma) Corp. Burlington, Massachusetts, USA	301836-41-9	1:1000

2.1.9 Equipment

Tabelle 11: Auflistung des verwendeten Equipments

<i>Equipment</i>	<i>Firma</i>
Axiostar Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
BioMark Genetic Analysis by Fluidigm®	Standard BioTools Inc., South San Francisco, USA
BioMark IFC Controller HX Fluidigm®	Standard Biotools Inc., South San Francisco, USA
Dauerpräparate-Box	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Eisbereiter AF-103	Scotsman, Great Blakeham, UK
IMPLEN NanoPhotometer® P330	IMPLEN GmbH, München, Deutschland
Inkubator Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Invitrogen Evos™ FL™ Imaging System, Mikroskop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank -20°C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Kühlschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Microbiological Safety Cabinet MSC Advantage 1.8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten Eppendorf Research® Plus, F1-Clip-Tip™ 10µl, 100µl, 1000µl, 5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Präparatemappe	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
PrimoVert, Axio Imager M2 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tischständer für Vernichtungsbeutel	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Vortexer Vibrofix VF1	Janke & Kunkel, IKA® Labortechnik
Wasserbad	Memmert, Büchenbach, Deutschland
Zentrifugen Heraeus™Megafuge™ 16; Heraeus™ Megafuge™ 17; Galaxy 5D	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.10 Plastikware, Verbrauchs- und Verwendungsgegenstände

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Plastikwaren, Verbrauchs- und Verwendungsgegenstände

<i>Plastikware/Gerät/Verbrauchsmaterial</i>	<i>Firma</i>	<i>Cat. No.</i>
0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	72.704 (0,5 ml) 72.706 (1,5 ml) 72.695.500 (2 ml)
24 Well cell culture Plate Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	662160
Anatomische Pinzette	F.S.T., Vancouver, Kanada	11000-16
Cell culture dishes 100x20 mm Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	664160
Deckgläser 24x40 mm	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland	BBAD02400400#S1
Deckgläser 24x50 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland	01-2450/1
Deckgläser rund Ø13 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland	01-0013/1
Deckgläser rund Ø8 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland	01-0008/1
Färbeküvette nach Hellendahl mit Erweiterung (Abmessungen: 60x85x100 mm)	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland	11-0020
Filter Pipette Tips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Wuxi NEST® Biotechnology Co., Jiangsu, China	310012 (20 µl), 316012 (100 µl), 313012 (1000 µl)
Finntip Filter 10 µl Pipettenspitzen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	94052000
Fisherbrand™ Gittereinsätze aus Karton	Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	118836893

Fisherbrand™ Kryoboxen aus Karton mit wasserabweisender Standardbeschichtung	Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	11557623
Mikroschere	F.S.T., Vancouver, Kanada	15000-03
Objektträger 76x26 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland	03-0013/45
PAP-Pen (Dako pen), Hydrophober Stift	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	Ab2601
Parafilm®M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	LOT #3110 P7793-1EA
Peha-Soft® Nitril Handschuhe	Hartmann, Heidenheim, Deutschland	9422012
Petrischalen Cellstar® 10 cm, nicht-behandelt	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	633181
Pipettenspitzen Clip-Tip™ 1-1000µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	4641170N (1-10 µl), 4641200N (10-100 µl), 4641230N (100-1000 µl)
Pipettenspitzen Clip-Tip™, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030073177
Precision Wipes	Kimtech science, Kimberly Clark Professional, Dallas, USA	7551
QIAshredder Mini Spin Column	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	1011711
RNeasy MinElute Spin Column	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	1026497
Röhre 15 ml, 120x17 mm, PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	62.554.502
Röhre 50 ml, 114x28 mm, PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	62.547.004
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	86.1253.025 (5 ml) 86.1254.001 (10 ml) 86.1685.001 (25 ml) 86.1256.001 (50 ml)
Spitze Pinzette	F.S.T., Vancouver, Kanada	11241-30

Sterican®Standardkanülen Gr.16, G23x1"" / Ø0,60x25 mm, blau	B.Braun, Melsungen, Deutschland	4657667
T25-Flaschen Cellstar®	Greiner Bio-One, Fricken- hausen, Deutschland	REF: 690160
Vernichtungsbeutel	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	86.1197

2.1.11 Kits

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Kits

<i>Kit</i>	<i>Firma</i>	<i>Cat. No.</i>
One-Step qRT-PCR Kit	CellsDirect™, Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	2050779
RNeasy® Micro Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	74004

2.1.12 Verwendete Produkte für die RNA-Aufbereitung, RNA-Präamplifizierung und RNA-Analyse

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Produkte für die RNA-Aufbereitung, RNA-Präamplifizierung und RNA-Analyse

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>	<i>Cat. No.</i>
20X GE Sample Loading Reagent	Standard BioTools Inc., South San Francisco, USA	100-7610
96-Well Tray Adapter	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, MA, USA	4305051
96.96 Dynamic Array™	Standard BioTools Inc., South San Francisco, USA	100-6172
96.96 Dynamic Array™ IFC for Gene Expression Fluidigm®	Standard BioTools Inc., South San Francisco, USA	BMK-M-96.96
96.96 GT Fast Sample and Assay Loading Kit with Control Line Fluid – 10 IFCs Fluidigm®	Standard BioTools Inc., South San Francisco, USA	89000021

Buffer RDD	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	1011132
Buffer RPE Wash buffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	169035169 / 1018013
Buffer RW1 Wash buffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	1014567 / 1053394
CellsDirect™ One-step qRT-PCR Kit	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	46-7201
Collection Tubes	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	19201
DNase I Stock solution	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	1023460 / 79254
Ethanol absolute for molecular biology	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A3678,0250
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	4346907
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	4311971
QIAshredder Mini Spin Column	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	1011711
RNase free water	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	129112
RNeasy MinElute Spin Column	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	1026497
RNeasy® Micro Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	74004
TaqMan® Universal PCR Master Mix, keine AmpErase™ UNG	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	4324018
TE Buffer pH 7,0	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	AM9861

2.1.13 Verwendete TaqMan™ Sonden / Assays für die RNA-Analyse

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten TaqMan™ Sonden / Assays für die RNA-Analyse

<i>Sonde / Assay</i>	<i>Firma</i>	<i>Cat. No.</i>
Gene Expression Assay GAPDH	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Hs99999905_m1
Gene Expression Assay KRT10	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Hs00166289_m1
Gene Expression Assay KRT14	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Hs00265033_m1
Gene Expression Assay KRT19	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Hs00761767_s1
Gene Expression Assay KRT5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Hs00361185_m1

2.1.14 Software

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Softwares

<i>Software</i>	<i>Firma</i>
Axio Vision 4.8.1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
BioMark Data Collection	Standard BioTools Inc., South San Francisco, USA
BioRender	BioRender, Toronto, USA
EndNote	Alasoft GmbH, Frankfurt, Deutschland
Fluidigm Real-Time PCR Analysis	Standard BioTools Inc., South San Francisco, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, WA, USA
StepOne™ Software	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ZEN / ZEN Lite 3.6	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Ethik

Die der Forschungsarbeit zu Grunde liegenden Ethikanträge mit den Nummern 638/2013BO1 und 205/2020BO2 wurden von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen positiv begutachtet.

2.2.2 Extraktion und Lagerung der Haarfollikel

Das Spenden von Haaren beruht auf freiwilliger Basis, alle Probanden haben die Informationsbroschüre, Datenschutzhinweise und Einwilligungserklärung gelesen und unterzeichnet. Es wird im gesamten Verlauf der Forschungsarbeit auf die Anonymisierung der Probanden geachtet.

In dieser Doktorarbeit wurden die HF von insgesamt fünf freiwilligen Spendern untersucht, hierbei waren drei der Spender männlich (Spender 1 = S1, Spender 4 = S4, Spender 5 = S5), die anderen beiden Spender waren weiblich (Spender 2 = S2, Spender 3 = S3).

Die folgenden Protokolle und Abläufe wurden durch Dr. Stefanie Klingenstein erläutert und orientieren sich an den Publikationen „From Hair to iPSCs – A Guide on How to Reprogram Keratinocytes and Why“ (Klingenstein et al., 2020) und „Generating iPSCs with a High-Efficient, Non-Invasive Method – An Improved Way to Cultivate Keratinocytes from Plucked Hair for Reprogramming“ (Wustner et al., 2022).

Die Haare/HF wurden mit einer geeigneten, abgerundeten und anatomischen Pinzette in der parietalen Kopfregion schnell senkrecht zur Kopfhaut herausgezupft (siehe **Abbildung 5**).

Die gezupften Follikel wurden nach der Extraktion durch den Untersucher umgehend beurteilt: Für die experimentelle Verwendung wurden nur die HF genommen, die folgende Qualitätskriterien erfüllen: Sie müssen sich in der anagenen Wachstumsphase befinden und nach der Extraktion eine sichtbare, weiße, äußere Wurzelscheide aufweisen. Schlechte HF, die sich in der telogenen Wach-

tumsphase befinden und keine sichtbare äußere weiße Wurzelscheide aufweisen, wurden verworfen (siehe **Abbildung 3 a**) (siehe **1.1.3.**) (Klingenstein et al., 2020).

Nach der Beurteilung wurden die anagenen HF umgehend in ein Reaktionsgefäß mit dem vorbereiteten Transport- bzw. Zwischenlagerungsmedium DMEM transferiert. Die Verwendung von DMEM als Zwischenlagerungsmedium wurde in vorausgehenden Versuchen als geeignetstes Medium validiert (Klingenstein et al., 2020). Eine sofortige Überführung der HF in das Medium ist zwingend nötig, da die Follikel sonst austrocknen und für die weitere Untersuchung und Kultivierung unbrauchbar wären, da bereits nach einer Exposition der HF an der Luft für mehr als 10 Sek. eine dramatische Austrocknung eines Großteiles der HF erfolgt (Wustner et al., 2022).

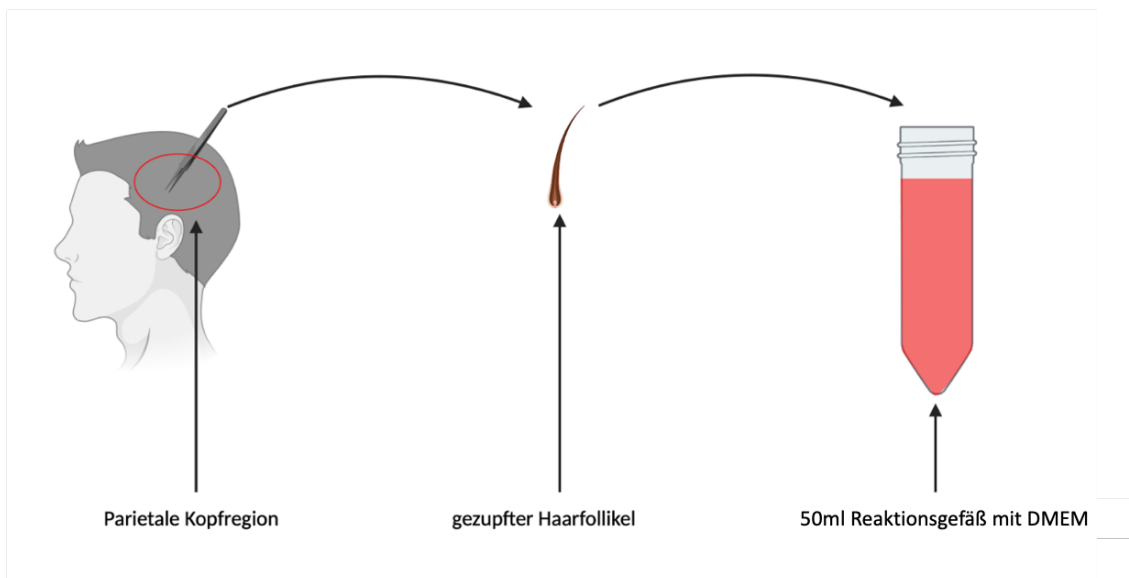


Abbildung 5: Zupfen der Haarfollikel (HF) in der parietalen Kopfregion, umgehender Transport des gezupften HF in das Transportmedium DMEM. Abbildung entworfen mit Bio-Render.com

Als nächstes wurden die HF inklusive des Transportmediums auf eine Petrischale mit ca. 10 cm Durchmesser gegeben und eine erneute gründliche Auswahl geeigneter anagener Follikel getroffen, nicht geeignete HF wurden verworfen.

Die verbleibenden HF wurden mit Hilfe einer spitzen Pinzette und einer kleinen Schere auf eine Länge von ca. 5-6 mm gekürzt. Es wurde darauf geachtet, in

diesem Schritt die äußere Wurzelscheide der HF nicht zu beschädigen und sie vollständig zu erhalten. Im Anschluss daran können die HF zur weiteren Kultivierung verwendet werden.

2.2.3 Kultivierung der Haarfollikel

2.2.3.1 Kultivierung der Haarfollikel für das Auswachsen von Keratinozyten

Die Kultivierung der HF findet in T25-Flaschen statt, welche mit je 750 μ l Matrigel® (1:10 verdünnt mit EpiLife®) beschichtet werden. Hierbei wurde darauf geachtet werden, dass der gesamte Flaschenboden mit Matrigel® benetzt ist. Anschließend folgt eine Inkubation der Flasche für eine Stunde im Brutschrank (37°C, bei 5 % O₂- und 5 % CO₂-Sättigung). Um nun die vorbereiteten HF (siehe 2.2.2) in die Flasche überführen zu können, wurde das überschüssige Matrigel® abpipettiert und im vorderen Bereich der Flasche kleine Tropfen aus Matrigel® (1:5 verdünnt mit EpiLife®) mit insgesamt ca. 10 μ l Volumen auf die Beschichtung aufpipettiert. In diese Tropfen wurden im Anschluss die zurechtgeschnittenen HF eingelegt.

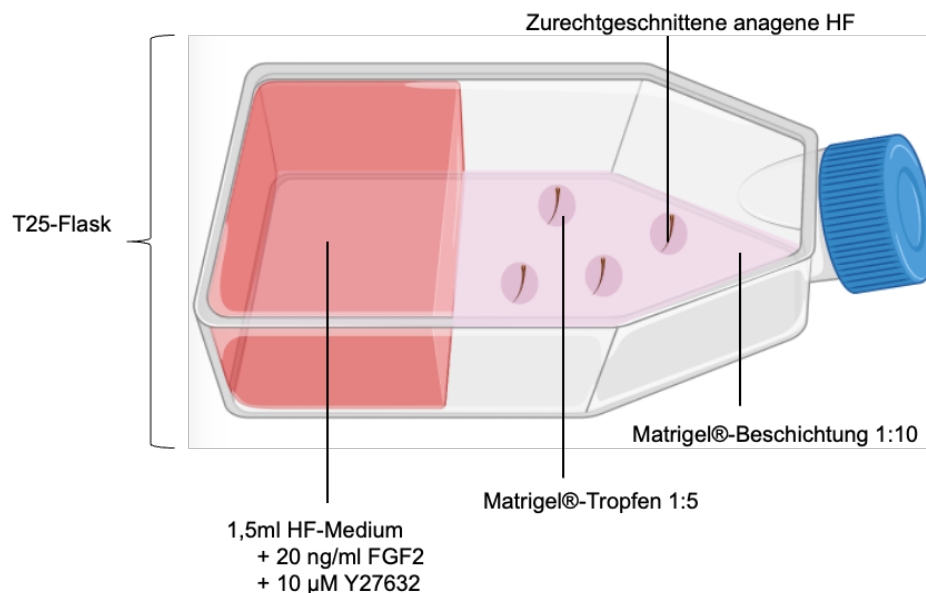


Abbildung 6: Darstellung T25-Flask. Flaschenboden mit Matrigel® 1:10 beschichtet inkl. Matrigel®-Tropfen 1:5 mit zurechtgeschnittenen anagenen Haarfollikeln (HF), Grundmedium (HF-Medium); Abbildung entworfen mit BioRender.com

Als nächstes wurde die Flasche erneut für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, sodass die HF mit einer gewissen Festigkeit am Flaschenboden fixiert sind. Nun kann eine erste mikroskopische Kontrolle mit gleichzeitiger fotografischer Dokumentation durchgeführt werden, um den Zustand der HF direkt nach der Ausplattierung zu erfassen.

Nach den Inkubationsschritten wurden die HF mit 1,5 ml HF-Medium versorgt, welches aus den in **Tabelle 17** aufgelisteten Bestandteilen hergestellt wurde.

Tabelle 17: Auflistung der Bestandteile und der Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Medium	Bestandteile	Zusätze (Endkonzentration)
HF-Medium (Grundmedium)	DMEM + 15% FCS + 1% GlutaMAX™ + 1% Nicht-essenzielle Aminosäuren + 1% Anti-Anti	+ 20 ng/ml FGF2 + 10 µM Y27632
Keratinocyten-Medium	Epilife® + 1:100 HKGS	+ 10 µM Y27632
Negativkontrolle Ampuwa®-Medium	Ampuwa®	-

Frisch hinzugegeben werden zu dem bereits vorbereiteten HF-Medium dann die Zusätze FGF2 (20 ng/ml) und Y27632 (10 µM).

Mit diesem Medium inkubierten die Flaschen für 24 h. Nach dieser Zeit wurde eine mikroskopische Kontrolle der HF am Evos™ Mikroskop durchgeführt, nach weiteren 24 h Inkubation erfolgte dann ein Wechsel des Mediums, daran anschließend tägliche Mediumwechsel bis zur Beendigung des Versuches.

Bei jeder mikroskopischen Kontrolle wurde darauf geachtet, ob an den HF am Flaschenboden bereits mikroskopisch das Auswachsen von Keratinocyten erkennbar ist. Falls sich noch kein Wachstum von Zellen erkennen ließ, wurden die HF weiterhin mit dem HF-Medium inkubiert.

Sobald die ersten Keratinozyten an den HF am Mikroskop erkennbar waren, erfolgte ein Mediumwechsel auf das Keratinozyten-Medium, welches aus EpiLife®, mit HKGS im Verhältnis 1:100 versetzt, besteht. Auch hier musste frisch 10 µM Y27632 zu dem Keratinozyten-Medium dazugegeben werden.

Es erfolgte eine tägliche Untersuchung und Kontrolle der HF und ein entsprechender Wechsel der Zellkulturmedien. Sollte der Fall eintreten, dass bereits nach 24h die ersten Keratinozyten ausgewachsen sein, wurde das Medium bereits nach 24 h auf EpiLife® + Zusätze gewechselt.

2.2.3.2 Mikroskopische Untersuchung der Haarfollikel und fotografische Dokumentation während der Kultivierungsvorgangs

Unter den oben genannten Voraussetzungen wurden die HF mit Hilfe des Evos™ Mikroskops täglich untersucht. Die erste mikroskopische Kontrolle und fotografische Dokumentation der HF in den Flaschen erfolgte am Tag der Ausplattierung nach der zweistündigen Inkubation im Brutschrank (siehe 2.2.2), bevor das Medium hinzugegeben wurde. Danach wurden täglich jeweils nach 24 h Inkubation, nach 48 h Inkubation, nach 72 h Inkubation und nach 96 h Inkubation die HF mikroskopisch untersucht und fotografisch dokumentiert. Dabei wurden alle Beobachtungen hinsichtlich der morphologischen Veränderung der HF, dem Zeitpunkt des Auswachsens der ersten Keratinozyten und der Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten sowie sonstige Besonderheiten notiert.

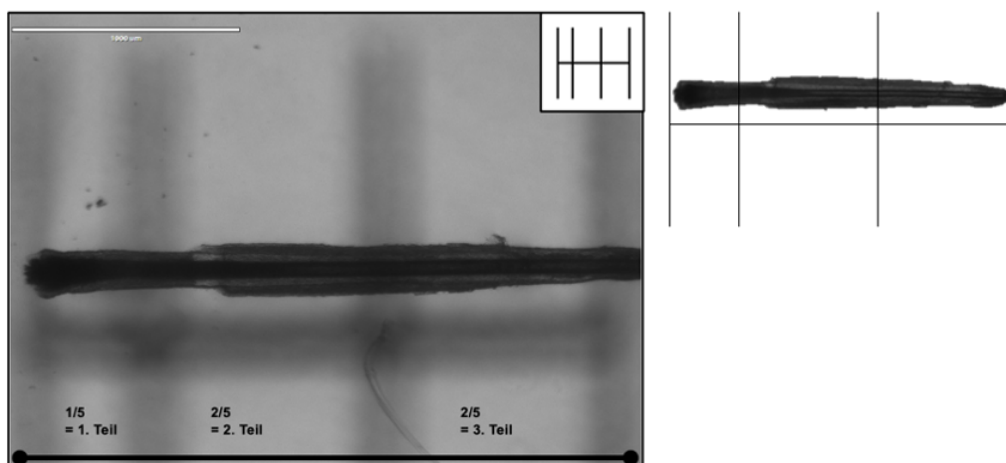


Abbildung 7: Device Line (0,3 cm = 3 mm; 0,25 Pt.) mit Haarfollikel (HF). Unterteilung in drei Teile: 1. Teil entspricht 1/5 der gesamten Länge von 0,3 cm, 2. und 3. Teil entsprechen je 2/5 der gesamten Länge von 0,3 cm

Für die objektive Beurteilung dieser Parameter wurde ein Device entwickelt (siehe **Abbildung 7**).

Das Device besteht aus einer waagrechten Linie, welche eine Länge von 0,3 cm hat. Senkrecht dazu sind 3 Linien hinzugefügt, welche eine Länge von 0,31 cm haben. Diese senkrechten Linien teilen das Device in drei Teile. Der erste Teil beträgt dabei 1/5 der gesamten Länge, der zweite und dritte Teil jeweils 2/5.

2.2.3.3 Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen von Keratinozyten an den Haarfollikeln durch Zugabe von verschiedenen Zellkulturzusätzen

In den unter 2.2.3.1 beschriebenen Versuchen wurden als Grundmedium das HF-Medium (siehe **Tabelle 17**) bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten verwendet. Für diese Versuchsreihe wurden hierzu verschiedene Zellkulturzusätze hinzugegeben.

Mit Hilfe dieser Zellkulturzusätze wurde im Verlauf getestet, ob die Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den HF von den Spendern S1, S2, S3 und S4 durch Zugabe dieser Zusätze beeinflusst und ggf. sogar verkürzt werden kann. Die Versuche wurden für jeweils 96 h angesetzt.

Folgende Zellkulturzusätze wurden verwendet:

Tabelle 18: Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der Keratinozyten an den HF mit Endkonzentration im Grundmedium

Zellkulturzusatz	Endkonzentration
A83-01	10 µM
DAPT	10 µM
EGF	20 ng/ml
IGF-1	20 ng/ml
SB431542	10 µM

Die jeweiligen Zusätze wurden zu dem HF-Grundmedium mit 20 ng/ml FGF2 und 10 μ M Y27632 hinzugegeben. Die jeweiligen Medien wurden nach der zweistündigen Inkubation, mikroskopischer Untersuchung und Foto-Dokumentation zu den ausplattierten HF gegeben. Im Anschluss daran wurde jeweils nach 24, nach 48, nach 72 und nach 96 h mikroskopiert und fotografiert, auch unter Zuhilfenahme des Devices. Sobald es zum Auswachsen von Keratinozyten gekommen war, wurde auf das Keratinozyten-Medium (siehe **Tabelle 17**) gewechselt ohne weitere Zugabe der verschiedenen Zellkulturzusätze.

Als Negativkontrolle wurde für alle Spender eine Versuchsreihe mit HF-Medium ohne jegliche Zusätze durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen wurden nach der Ausplattierung, nach 24, 48, 72 und 96 h Inkubation mikroskopische Kontrollen durchgeführt und überprüft, ob Keratinozyten ausgewachsen waren. Sobald Keratinozyten ausgewachsen waren, wurde ebenfalls auf das Keratinozyten-Medium gewechselt.

2.2.3.4 Doppeldeckgläserversuche

Neben der Ausplattierung von HF in T25-Flaschen kann man diese auch auf Deckgläsern kultivieren. Diese Methode eignet sich sehr gut, um die HF mit den ausgewachsenen Keratinozyten im Anschluss an das Experiment immunhistochemisch zu färben. Für diese Art des Versuchs wurde eine 24 Well-Platte benötigt (siehe **Abbildung 8**), von denen die HF auf die innersten vier Wells ausplattiert wurden.

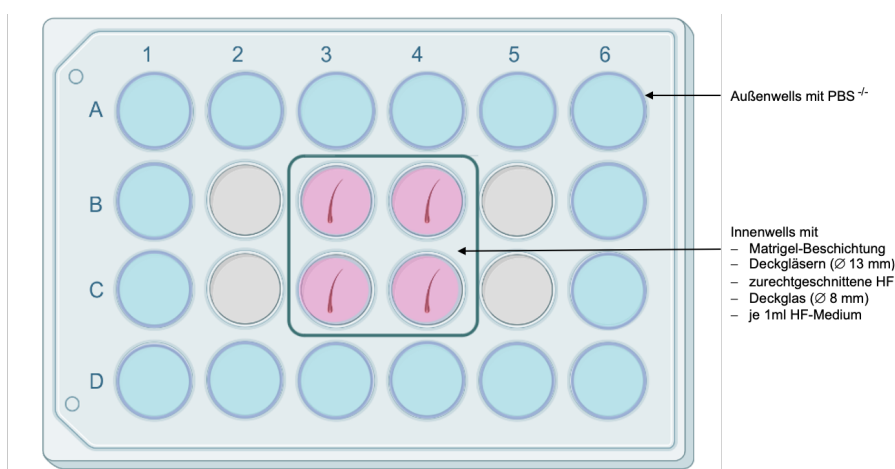


Abbildung 8: 24 Well-Platte. Innenwells mit je 1ml HF-Medium und zurechtgeschnittenen Haarfollikeln (HF); Außenwells mit PBS^{-/-}; Abbildung entworfen mit BioRender.com

In diese Wells wurde vorsichtig je ein Deckglas mit einem Durchmesser von 13 mm mit Hilfe einer Pinzette eingelegt. Nun wurde auf jedes dieser Deckgläser 350 µl Matrigel® (1:10 verdünnt mit EpiLife®) pipettiert. Es erfolgte, wie auch bei den T25-Flaschen (siehe 2.2.3.1), die Inkubation im 37°C warmen Brutschrank (bei 5 % O₂- und 5 % CO₂-Sättigung) für eine Stunde. Nach der Inkubation wurde das überschüssige Matrigel® aus den Wells abpipettiert und die vorbereiteten, zurechtgeschnittenen anagenen HF (siehe 2.2.2) wurden auf das beschichtete Deckglas gegeben. Im Anschluss daran wurde ein rundes Deckglas mit einem Durchmesser von 8 mm präzise auf den HF aufgelegt, sodass dieser vollständig von dem kleinen Deckglas bedeckt wurde (siehe **Abbildung 9**). Nun wurden je 1 ml des HF-Mediums pro Well zur Kultivierung hinzugegeben. Zusätzlich wurden die 16 Außenwells der Platte mit PBS ^{-/-} aufgefüllt, um einem Austrocknen vorzubeugen.

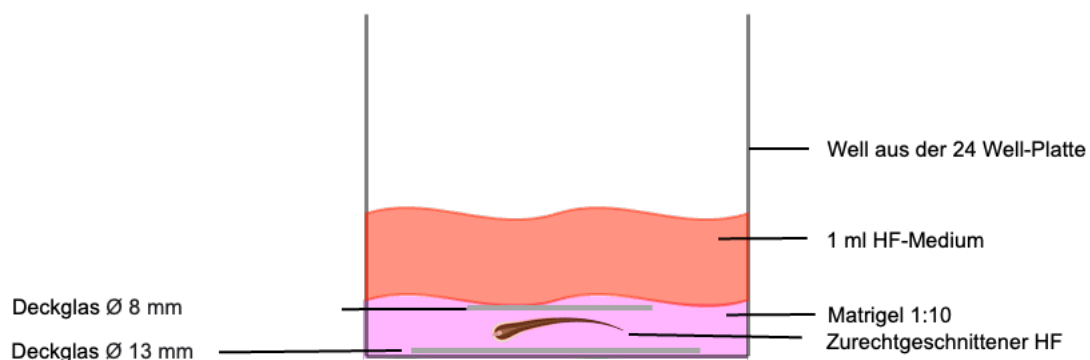


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Wells aus den Doppeldeckglasversuchen mit Beschichtung (Matrigel®), Deckgläsern, Haarfollikel (HF) und HF-Medium

Auch bei diesen Versuchsansätzen wurde täglich kontrolliert, ob bereits Keratinozyten ausgewachsen sind. Sobald die ersten Keratinozyten ausgewachsen waren, wurde auf das Keratinozyten Medium (je 1 ml pro Well) gewechselt.

2.2.3.4.1 Fixierung der Haarfollikel aus den Doppeldeckgläserversuchen

Sobald an den HF aus den Doppeldeckgläserversuchen (siehe 2.2.3.4) Keratinozyten ausgewachsen sind, müssen diese für die anschließende Färbung inklusive der ausgewachsenen Keratinozyten fixiert werden. Dafür pipettiert man zunächst das noch vorhandene Medium aus den jeweiligen Wells vorsichtig ab. Nach einem Waschschrift mit PBS^{-/-} wurde zu den Zellen jeweils 350 µl 4% PFA-Fixierlösung gegeben, welche für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das PFA abpipettiert und ein weiteres Mal für 5 min. mit PBS^{-/-} gewaschen. Bis zur Immunfluoreszenzfärbung (IF-Färbung) wurden die Zellen in PBS^{-/-} bei 4°C gelagert.

2.2.3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung der Keratinozyten aus den Doppeldeckgläserversuchen

Die fixierten Zellen lagern in PBS^{-/-}, was im ersten Schritt der IF-Färbung abgenommen werden muss. Anschließend wurde zur Permeabilisierung zu jedem HF pro Well 350 µl Triton™-X 0,5 % pipettiert und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Auf einen Waschschrift mit PBS^{-/-} folgte die Zugabe der Magermilchpuffer-Lösung (MMP-Lösung, Zusammensetzung siehe **Tabelle 9**), mit der für 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Inkubationszeit wurde die MMP-Lösung abpipettiert und die vorbereitete primäre Antikörperlösung (MMP-Lösung + primärer AK im Verhältnis 1:100 oder 1:200) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 90 Min. bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit 700 µl PBS^{-/-} gewaschen und die angesetzte Sekundär-Antikörperlösung zugegeben (PBS^{-/-} + DAPI (1:1000) + sekundäre AK (1:1000)) und für 60 Min. bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die sekundären Antikörper müssen hierfür zuvor in einer Kühlzentrifuge bei +4°C zentrifugiert werden. Nach zwei Waschschriften mit PBS^{-/-} für jeweils 5 Min. und einem Waschschrift mit Aqua dest. für 10 Sek. wurden die Doppeldeckgläser mit 150 µl Mowiol® eingedeckelt (siehe **Abbildung 10**). Die Lagerung der Objektträger erfolgt in einer Dauerpräparate-Box bei +4°C im Kühlschrank.

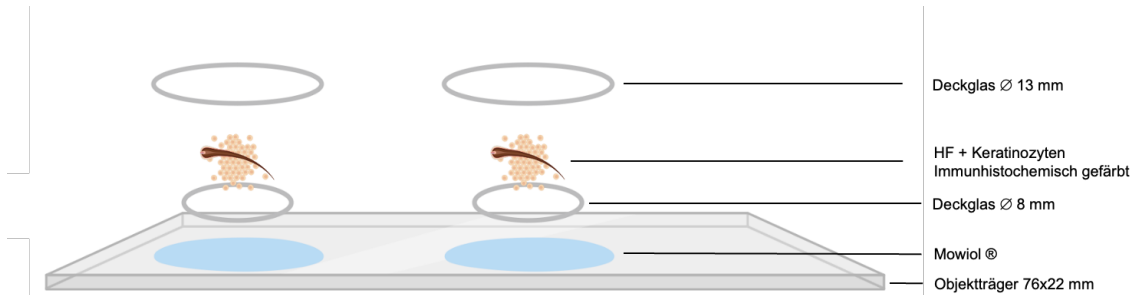


Abbildung 10: Darstellung des Eindeckungsvorgangs der immunhistochemisch gefärbten Haarfollikel (HF) inkl. Keratinozyten aus den Doppeldeckgläserversuchen
 Einzelne Bestandteile beschriftet und separiert dargestellt zur besseren Übersicht.
 Abbildung erstellt mit BioRender.com

2.2.4 Quantifizierung der morphologischen Veränderung der Haarfollikel während der Inkubation

Nach dem initialen Ausplattieren der HF wurden die HF für mindestens 96 h unter Verwendung des HF- und Keratinozyten-Mediums kultiviert. In dieser Zeit konnten morphologische Veränderungen der HF beobachtet werden, die mit Hilfe des Devices (siehe **Abbildung 11**) objektiv ausgewertet wurden. Es wurden insgesamt vier unabhängige Versuchsdurchläufe gestartet, wobei folgende Parameter für alle vier Spender analysiert wurden:

- Dickenzunahme der äußeren Wurzelscheide an einer definierten Position

Um nachweisen zu können, dass diese morphologischen Veränderungen der HF über die Zeit der Inkubation durch die Zugabe der HF- und Keratinozyten-Medien mit ihren Zusätzen ausgelöst wurden, wurde zusätzlich für die Spender S1, S2, S3 und S4 jeweils eine Versuchsreihe als Negativkontrolle gestartet. Hierfür wurde als Grundmedium 1,5 ml Ampuwa® verwendet. Das Ampuwa®-Medium wurde erstmals nach 48 h gewechselt, danach erfolgte ein täglicher Ampuwa®-Mediumwechsel über eine Gesamtversuchsdauer von insgesamt 96 h.

Die HF aller Bedingungen wurden mit dem Durchlichtmikroskop täglich über eine Gesamtversuchsdauer von 96 h aufgenommen und in Power Point standardisiert bearbeitet. Die Versuchsdauer von 96 h wurde gewählt, da durch die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Versuche evaluiert werden konnte, dass in diesem Zeitraum das Auswachsen der ersten Keratinozyten erwartet werden kann.

Die Fotografien der jeweiligen HF (inkubiert mit HF- und Keratinozyten-Medium sowie auch dem Ampuwa®-Medium), welche mit Hilfe des Evos Mikroskop angefertigt wurden (siehe 2.2.3.2), wurden in Microsoft PowerPoint geöffnet und mit einer Breite von 6,5 cm dargestellt. Die Fotos vom Tag der Ausplattierung, nach 24 h, 48 h, nach 72 h und nach 96 h Inkubation wurden analysiert. Zur Quantifizierung wurde ein Grund-Device designet (siehe **Abbildung 11**). Das Device besteht aus einer waagrechten Linie mit einer Länge von 6,5 cm. Senkrecht dazu sind drei weitere Linien mit einer Länge von 0,41 cm eingefügt.



Abbildung 11: Device zur Beurteilung der morphologischen Veränderung der Haarfollikel; Länge 6,5 cm mit 3 senkrechten Linien von jeweils 0,41 mm Länge

Dieses Device wurde in das Foto nach 96 h Inkubation eingefügt. Das Device wurde so platziert, dass die waagrechte Linie in der Mitte des Haarschafts des jeweiligen zu untersuchenden Follikels zu liegen kam. Es wurde darauf geachtet, dass der erste senkrechte Strich an der Spitze der Papille des jeweiligen zu untersuchenden HF angelegt wurde. Nun wurde das Device für die jeweilige Versuchsreihe modifiziert. Der zweite senkrechte Strich wurde an die Stelle des HF platziert, an der die größte Dicke der äußeren Wurzelscheide des HF sichtbar war. Das so modifizierte Device wurde anschließend in jedes Foto der jeweiligen Versuchsreihe eingefügt. Es wurde bei allen fünf Fotografien darauf geachtet, dass die erste senkrechte Linie an der Spitze der Papille platziert wurde (Beispiel siehe **Abbildung 12**).

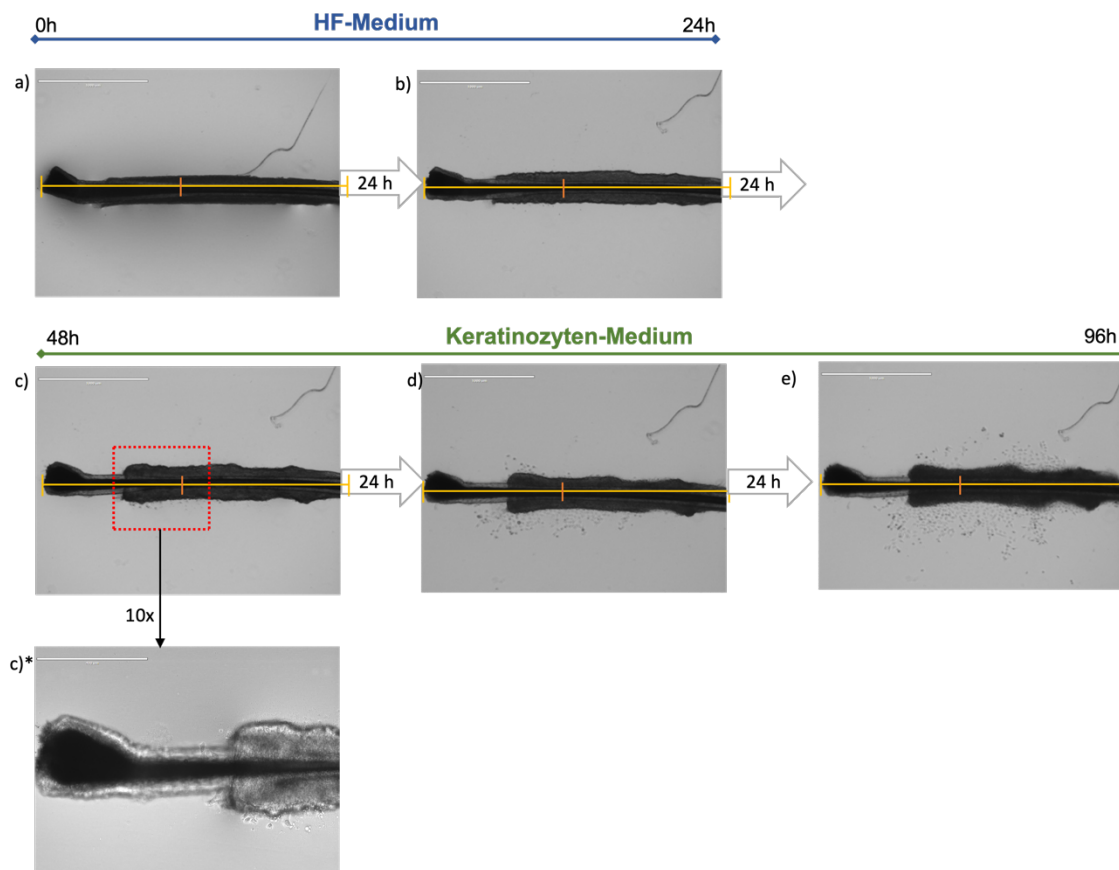


Abbildung 12: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF)

Beispiel zur Verdeutlichung der Dokumentation der morphologischen Veränderung der HF mit dem selbst designten Device – HF in 4facher- Vergrößerung (a) – e); Maßstab 1000 µm) und 10facher-Vergrößerung (c)*; Maßstab 400 µm) mit Evos™ Mikroskop fotografiert; Roter Kasten zeigt Bereich des Auswachsens der Keratinozyten, dieser Bereich ist in c)* vergrößert dargestellt

Abschließend wurde in PowerPoint die gesamte Dicke der äußeren Wurzelscheide des HF im Bereich des zweiten senkrechten Striches ermittelt und graphisch dargestellt.

Dieses Vorgehen wurde für jede der insgesamt 16 Versuchsreihen (je vier pro Spender) an einem ausgewählten HF der jeweiligen Versuchsreihe wiederholt, ebenso an einem HF der Versuchsreihe für die Negativkontrolle.

2.2.5 Histologische Färbung der Haarfollikel

Für die histologische Färbung wurden Kryoschnitte von Längs- und Querschnitten der HF angefertigt. Diese 14 µm dicken Schnitte waren bereits vorhanden und konnten direkt für die histologische Färbung eingesetzt werden.

Dafür wurden die Objektträger mit den fixierten HF zu Beginn für 5 Min. in 100 ml PBS^{-/-} in einer Glasküvette rehydriert. Nach dieser Zeit wurden die Objektträger in eine Glasküvette mit 100 ml Aqua dest. überführt und für exakt 30 Sek. in eine Glasküvette mit 100 ml der 1:2 in Aqua dest. verdünnten Hämalaun-Lösung überführt. Durch diesen Schritt werden die Zellkerne innerhalb der Schnitte blau angefärbt. Nach der Inkubation in der sauren Hämalaun-Lösung wurde der Objektträger zum Bläuen in eine Glasküvette mit 100 ml Leitungswasser überführt. Für die Gegenfärbung mit Eosin wurden die Objektträger aus dem Aqua dest. in eine Küvette mit 100 ml Eosin überführt, um dort für 30 Sek. zu verbleiben. Nach diesen 30 Sek. wurden die Objektträger umgehend zurück in die Küvette mit Aqua dest. überführt, um den überschüssigen Farbstoff abzuwaschen. Als Ergebnis zeigen sich Zytoplasma und Kollagenfasern rötlich gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 95 %, 100 % für je 30 Sek.) entwässert. Nach der Alkoholreihe wurden die Objektträger in Xylol geklärt. Abschließend wurden die Schnitte für die anschließende Mikroskopie mit Hilfe des DPX new-Eindeckelmediums eingedeckelt.

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung der Haarfollikel

Für die IF-Färbung wurden die zu färbenden Schnitte, welche im Kühlschrank bei 4°C lagern, in eine Glasküvette mit PBS^{-/-} überführt, um für 5-15 Min. zu rehydrieren. Nun wurden die Objektträger mit Hilfe eines aufsteigenden Ethanol-Gradienten behandelt. Hierbei wurden die Präparate jeweils für 30 Sek. zuerst in 70 %, in 95 %, in 100 %, in 95% und abschließend wieder in 70 % Ethanol-Lösung inkubiert.

Sobald die Präparate im aufsteigenden Ethanol-Gradienten behandelt wurden, erfolgte eine enge Umrandung dieser mit Hilfe eines hydrophoben PAP-Pen (siehe **Abbildung 13**).

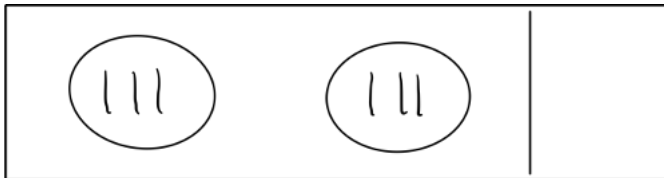


Abbildung 13: Beispielbild Objektträger mit HF längs (je 3 pro Präparat) umrandet mit hydrophobem PAP-Pen

Durch die Umrandung der Präparate mit dem hydrophoben Pen wurde verhindert, dass sich die während des Färbeprozesses verwendeten Lösungen vermischen. Gleichzeitig wurde so ein präzises Einwirken der Lösungen am gewünschten Präparat gewährleistet.

Es folgte eine Inkubationszeit mit der Magermilchpuffer-Blockierlösung (MMP-Lösung, Bestandteile siehe **Tabelle 9**) von 30 Min. bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde die Blockierlösung sorgfältig auf ein Zellstofftuch abgeklopft und die primäre Antikörperlösung auf die Präparate pipettiert. Die primären Antikörper wurden zuvor in der gleichen MMP-Lösung in einem Verhältnis von 1:100 oder 1:200 angesetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht (insgesamt für ca. 17-20 h) bei +4°C im Kühlschrank.

Am darauffolgenden Morgen wurden die Präparate für ca. 5-15 Min. in PBS^{-/-} gewaschen, bis die MMP-Lösung von den Präparaten entfernt war.

Zur Herstellung der sekundären Antikörper-Lösung müssen die sekundären Antikörper in einer Kühlzentrifuge bei +4°C zentrifugiert werden.

Anschließend werden sie mit PBS^{-/-} und DAPI auf Eis angesetzt.

Die vorbereitete sekundäre Antikörperlösung konnte nun auf das jeweilige Präparat pipettiert werden. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht. Nach der Inkubationszeit wurden die Präparate erneut sorgfältig abgeklopft, um die sekundäre Antikörperlösung zu entfernen, und dann für 5 Min. in PBS^{-/-} gewaschen. Nach dem Waschvorgang mit PBS^{-/-} folgte ein weiterer Waschschrift mit Aqua dest. für 10 Sek.

Die Präparate konnten schließlich mit Mowiol® eingedeckelt werden. Die Lagerung der Objektträger erfolgt in einer Dauerpräparate-Box bei +4°C im Kühlschrank.

2.2.7 RNA-Aufbereitung, Messung der RNA-Konzentration und RNA-Analyse

2.2.7.1 Einfrieren von ausgewachsenen Keratinozyten und Haarfollikel

Für die quantitative Bestimmung der Genexpression von gezupften HF und ausgewachsenen Keratinozyten mussten die Keratinozyten zunächst aus den Zellkulturgefäßen abgelöst werden. Zunächst wurden mithilfe von 4 ml PBS^{-/-} die abgestorbenen Keratinozyten aus dem konfluenten Zellrasen in der T25-Flasche aus dem Mediumüberstand entfernt. Durch Zugabe von 600 µl Keratinozyten-Dispase und die Inkubation für 10 Min. bei 37°C und 5 % O₂- und CO₂-Sättigung im Brutschrank wurden die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Keratinozyten und von ihrem Untergrund (ab)gelöst und die Zellen wurden vereinzelt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit PBS^{-/-} von der Flasche abgespült und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Durch die Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Min. setzen sich die Zellen ab und das Zellpellet wurde mit 350 µl RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol (βMeETOH) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -75°C gelagert.

Für die Lyse der gezupften HF wurde genauso vorgegangen wie bei den Keratinozyten, die lysierten Zellen wurden bei -75°C gelagert.

2.2.7.2 RNA-Aufbereitung und Konzentrationsmessung

Für die Gewinnung von RNA aus den tiefgefrorenen und bereits lysierten Keratinozyten- und HF-Proben wurde das RNeasy Micro Kit nach Hersteller Angaben verwendet. Die RNA wurde mit 16 µl RNase freiem Wasser eluiert und anschließend bei -75°C gelagert.

Für die Messung der RNA Konzentration wurde das IMPLEN® Nanophotometer mit der LID10 (für die Messung der RNA-Konzentration der HF) und LID50 (für die Messung der RNA-Konzentration der Keratinozyten) verwendet. Die Konzentrationen der gemessenen Proben lagen in dem Umfang von 5,6 – 37,6 ng/ml bei der RNA der HF und in einem Umfang von 740 – 1294 ng/ml bei der RNA der Keratinozyten.

2.2.7.3 cDNA-Synthese, Pre-Amplifikation und Fluidigm Lauf

Für die cDNA Synthese wurde das CellsDirect™ One-Step qRT-PCR Kit (nach Herstellerangaben) verwendet. Zur Ladung der Platten wurde das BioMark IFC Controller HX Fluidigm® verwendet. Nach dem Ladeprozess wurden die Samples und TaqMan™ Assays, welche mit FAM MGB markiert sind, als Doppelbestimmungen in die vorgesehenen Inlets der Array IFC Platte pipettiert. Für den Fluidigm Lauf wurde die Platte in das BioMark Genetic Analysis by Fluidigm® platziert und das StepOnePlus™ Real-Time PCR System wurde gestartet. Für die darauffolgende Auswertung und Analyse wurde die StepOne™ Software verwendet. Die Berechnung der Werte wurde mit Hilfe von Excel durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse (relative Quantifizierung; (Pfaffl, 2001)) wurde auf das interne Referenzgen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)* verrechnet, d.h. die qRT-PCR Daten wurden auf *GAPDH* als intern verwendetes Referenzgen normalisiert. Eins der am häufigsten verwendeten „Housekeeping Gene“ ist *GAPDH* (Barber et al., 2005), da es in allen Zelltypen mit Zellkern vorkommt und dabei obligat für das Überleben der Zelle ist (Pfaffl, 2001). Aus diesem Grund wurde auch für unsere Genexpressionsanalyse der Keratine *GAPDH* als „Housekeeping-Gen“ für die relative Quantifizierung verwendet.

Hierfür wurde sowohl der Mittelwert von *GAPDH* als auch von dem zu untersuchenden Keratin (=K) berechnet. Anschließend wurde folgende Formel (siehe **Formel 1**) verwendet:

Formel 1: Formel für die relative Quantifizierung der RNA Daten mit Hilfe von GAPDH als Referenzgen

$$\Delta CT(X) = 2^{\Delta} - (\text{Mittelwert}(K) - \text{Mittelwert}(GAPDH))$$

2.2.8 Statistik

Bei der Berechnung der verschiedenen Versuche wurde mit Hilfe von Microsoft Excel der Median-Wert berechnet.

Ansonsten wurde für die relative Quantifizierung die oben aufgeführte Formel (siehe **Formel 1**) verwendet.

Bei den Versuchen zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten wurden die jeweiligen Median-Werte der Spender berechnet. Hierfür wurden den einzelnen HF Zeitwerte zugeordnet. Sollten während der 96-stündigen Inkubation HF abgeschwommen sein, wurde ihnen der Wert „0“ zugeteilt, ebenso, wenn an den inkubierten HF nach 96 h keine Keratinozyten ausgewachsen sein sollten.

Ansonsten bekamen die HF folgende Werte zugeteilt:

„24“, wenn nach 24 h Inkubation die ersten Keratinozyten ausgewachsen sind,
„48“, wenn nach 48 h Inkubation die ersten Keratinozyten ausgewachsen sind,
„72“, wenn nach 72 h Inkubation die ersten Keratinozyten ausgewachsen sind,
und „96“, wenn nach 96 h Inkubation die ersten Keratinozyten ausgewachsen sind.

Für die jeweiligen Zellkulturzusätze wurden die Median-Werte mit Hilfe von Excel berechnet, hierbei wurden die „0“-Werte (abgeschwommene HF und HF ohne ausgewachsene Keratinozyten) bei der Berechnung exkludiert, da sich sonst die Ergebnisse verfälscht hätten (Werte im Anhang siehe **Tabelle 31**).

Die Berechnung der Signifikanzen (siehe **3.7** und **Abbildung 30**) erfolgte mit dem TTEST mit den folgenden p-Werten: $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ *** (TTEST 2-seitig; Typ 1).

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Varianz der gezupften Haarfollikel

HF durchlaufen in ihrem Lebenszyklus verschiedene Stadien, die man auch in den gezupften Exemplaren (insgesamt n= 330 HF) entdecken kann. Die telogenen und anagenen HF unterscheiden sich dabei deutlich in ihrem Erscheinungsbild (siehe **Abbildung 14**). Die anagenen HF bestehen neben der dermalen Papille und dem Haarschaft zusätzlich noch aus der inneren und äußeren Wurzelscheide. Die äußere Wurzelscheide ist bei der optischen Betrachtung ohne Hilfsmittel meist als weiße Schicht erkennbar, die den HF umgibt. Bei den telogenen HF sieht man nur die dermale Papille und den Haarschaft, es ist jedoch keine innere oder äußere Wurzelscheide vorhanden.

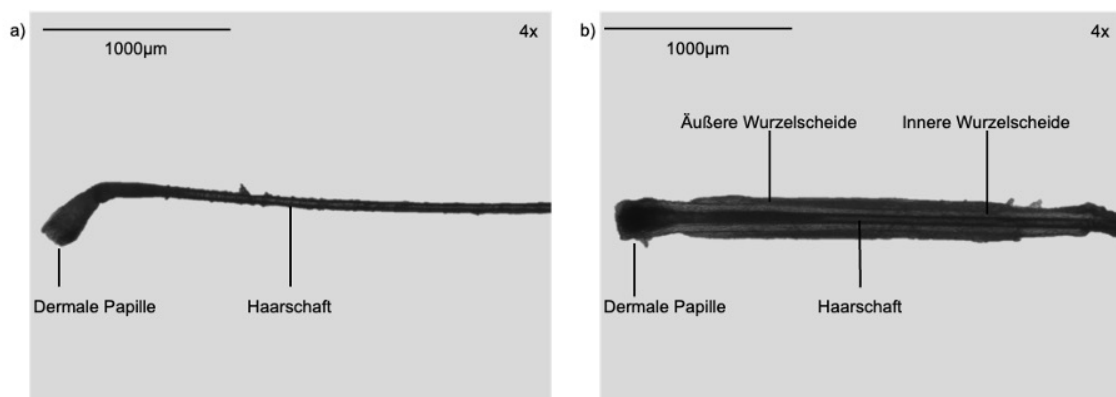


Abbildung 14: Morphologische Varianz der gezupften Haarfollikel (HF) im Hinblick auf den Wachstumszyklus

a) telogener HF (beschriftet) mit dermaler Papille und Haarschaft, ohne sichtbare äußere und innere Wurzelscheide

b) anagener HF (beschriftet) mit dermaler Papille, Haarschaft sowie sichtbarer äußerer und innerer Wurzelscheide

Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000µm.

Auch innerhalb der analysierten anagenen HF konnte eine große morphologische Varianz beobachtet werden (siehe **Abbildung 15**).

Zum einen ist erkennbar, dass bei den anagenen HF der Abstand von der dermalen Papille bis zum Beginn der äußeren Wurzelscheide variieren kann (siehe **Abbildung 15 a**). Zum anderen zeigt sich, dass sowohl die dermale Papille zum Haarschaft hin als auch der HF insgesamt abgelenkt sein kann (siehe **Ab-**

bildung 15 b)). Außerdem war bei der Untersuchung der verschiedenen anagenen HF erkennbar, dass die innere und auch äußere Wurzelscheide über den Verlauf des Haarschafts unterbrochen oder unvollständig sein kann (siehe **Abbildung 15 c)**).

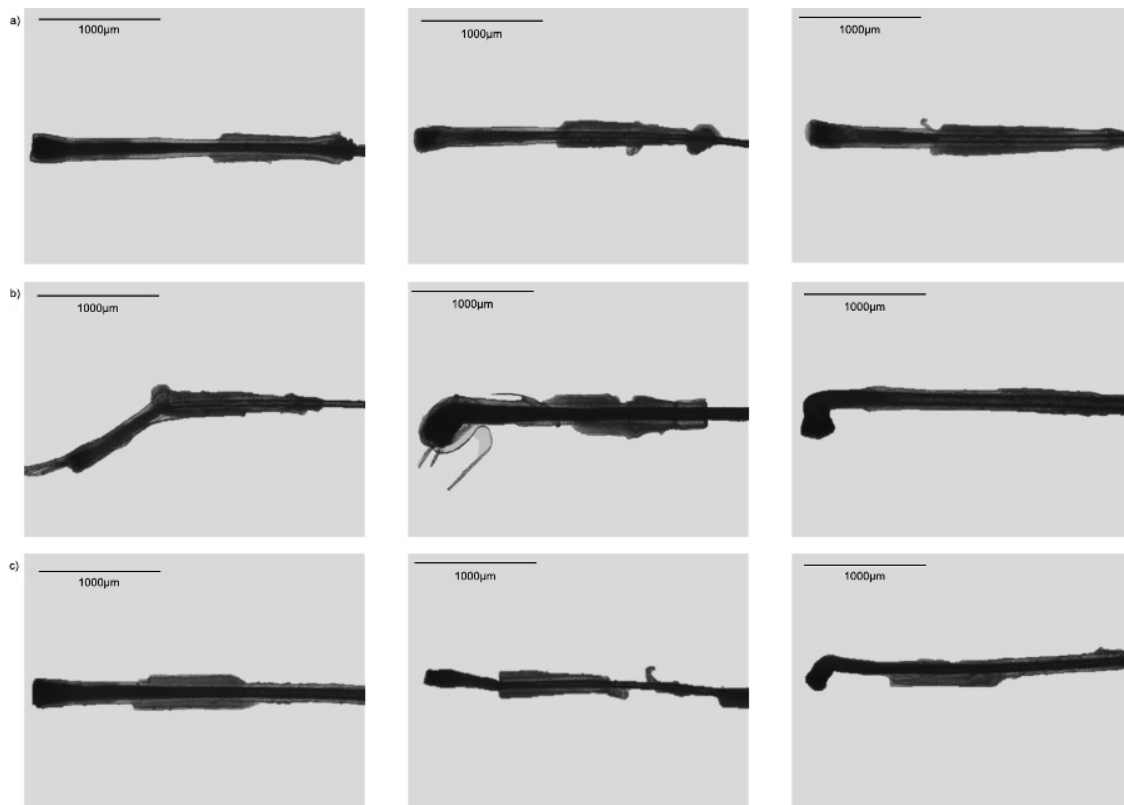


Abbildung 15: Bilder unterschiedlicher anagener Haarfollikel (HF) mit großer anatomisch-morphologischer Verschiedenheit/Varianz

a) Abstand dermalen Papille bis Beginn äußere Wurzelscheide

b) Abknickungen im Bereich der Papille und des HF selbst

c) Unvollständig ausgeprägte innere und äußere Wurzelscheide

Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000 µm

3.1.1 Dermal sheath

Die HF in der Haut weisen, wie in **Abbildung 2** ersichtlich, neben der dermalen Papille, dem zentral gelegenen Haarschaft und der äußeren und inneren Wurzelscheide nach außen hin ihre *dermal sheath* auf. Zusätzlich sind die HF mit Talgdrüsen und über die Ausbuchtung des HF mit dem M. arrector pili assoziiert. Werden die HF nun gezupft und aus ihrer ursprünglichen Umgebung (der Haut) entfernt, kann in den meisten Fällen an den gezupften HF nur noch die dermale Papille, der Haarschaft sowie die äußere und innere Wurzelscheide identifiziert werden. Von den insgesamt 330 HF, die in dem Rahmen der Dissertation gezupft

und analysierten wurden, konnten jedoch 6 HF examiniert werden, die noch eine (zum Teil) intakte *dermal sheath* aufwiesen (siehe **Abbildung 16**). Diese HF verhielten sich hinsichtlich ihrer Inkubation anders. Zudem konnte beobachtet werden, dass es sich bei den auswachsenden Zellen vermutlich nicht um Keratinozyten handelte. Aus diesem Grund wurden die HF mit sichtbarer *dermal sheath* bei den Analysen und Berechnungen ausgeschlossen.

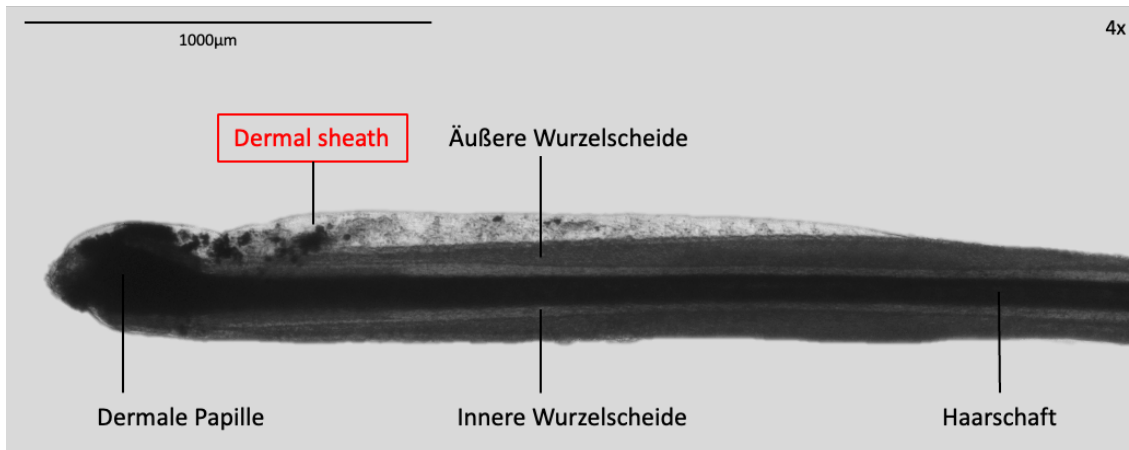


Abbildung 16: Haarfollikel (beschriftet) inklusive intakter *dermal sheath*
Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000µm

3.1.2 Haarfollikel mit ausgewachsenen Zellen im Bereich der dermalen Papille

Von den insgesamt 330 analysierten HF konnten bei zwei untersuchten HF das Auswachsen von Zellen im Bereich der dermalen Papille beobachtet werden. Bei diesen HF war proximal lediglich die dermale Papille vorhanden, welche von einer Bindegewebsschicht umgeben war, entlang der Haarschaftes zeigte sich weder eine äußere noch eine innere Wurzelscheide.

Diese HF sind in untenstehender Abbildung (siehe **Abbildung 17**) sowohl in 4-

facher als auch in 10-facher Vergrößerung dargestellt. Diese beiden HF wurden bei den Analysen und Berechnungen ebenfalls nicht mitberücksichtigt.

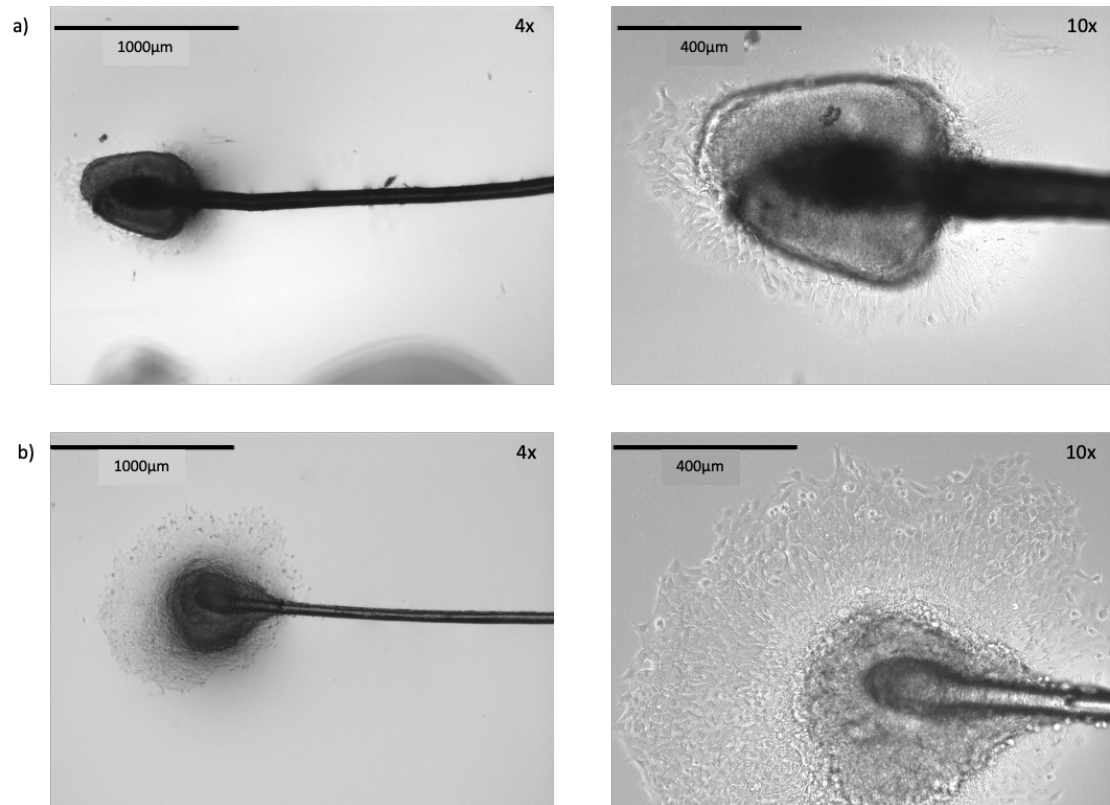


Abbildung 17: Haarfollikel mit ausgewachsenen Zellen im Bereich der dermalen Papille
a) nach 96 h Inkubation; b) nach 196 h Inkubation
Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher (links) und 10-facher (rechts) Vergrößerung, Maßstab 1000 μm (links) und 400 μm (rechts)

3.2 Morphologische Varianz der ausgewachsenen Keratinozyten

Bei Betrachtung der ausgewachsenen Keratinozyten an anagenen HF mit intakter äußerer Wurzelscheide zeigte sich, dass die Keratinozyten an den inkubierten HF in einer unterschiedlichen morphologischen Varianz auswuchsen. Exemplarisch zeigt **Abbildung 18** unterschiedliche Keratinozyten kultiviert unter Standardbedingungen mit dem HF-Medium und dem Keratinozyten-Medium nach 192 h Inkubation.



Abbildung 18: Keratinozyten fotografiert (nach 192h Inkubation mit HF-Medium + Keratinozyten-Medium) mit ihrer unterschiedlichen Morphologie
Hervorheben einzelner Keratinozyten (roter Kasten,) inkl. Beschriftung
a) Spindelförmig, b) Quadratisch, c) Keratinozyt in Mitosephase, d) Vermutlich ausdifferenzierter Keratinozyt, e) Säulenförmig, f) Abgestorbene und abgeschwommene Keratinozyten
Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 200 µm

Die markierten Keratinozyten sollen in ihrem Aufbau und in ihrer Morphologie im Folgenden näher beschrieben werden:

a) Der Keratinozyt zeigt sich in einer spindelförmigen Ausprägung, der Zellkern liegt zentral und zeigt sich eher oval. Von dort zieht sich das Zytoplasma zu beiden Seiten in einer Linie nach rechts und links leicht breiter werdend aus.

b) Bei dieser Art von Keratinozyt zeigt sich das Zytoplasma eher quadratisch mit mehreren Zytoplasma-Ausläufern in Richtung 12 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr und 9 Uhr. Der Nucleus zeigt sich rund bis oval, der Nucleolus ist bei dieser Zelle deutlich erkennbar.

c) Hier wurde ein Keratinozyt in der Mitosephase mikroskopiert, der Zellkern teilt sich in diesem Moment. Man kann die beiden Nucleoli erkennen und die noch vorhandene Nucleolemmabrücke zwischen den beiden neuen Zellkernen. Die Zelle insgesamt ist recht groß, was ebenfalls auf eine baldige Zellteilung hinweist.

d) Hier ist ein großer Keratinozyt mit beinahe kubischer, polygonaler Morphologie mikroskopisch erkennbar. Zytoplasma-Ausläufer sind in dieser Schnittachse nicht erkennbar, jedoch können Zellkern und Kernkörperchen ausgemacht werden. Dieser Keratinozyt ist vermutlich ausdifferenziert.

e) Dieser Keratinozyt hat einen eher säulenförmigen Zellkörper, der Zellkern zeigt sich oval. Es sind zwei Zytoplasma-Ausläufer erkennbar am oberen und unteren Pol der Zelle, jeweils in eine andere Richtung. Im Vergleich zu dem mit a) markierten Keratinozyten, der eine morphologische Ähnlichkeit aufweist, ist Zelle e) jedoch deutlich kleiner.

f) Die hier umrahmten Zellen sind abgestorbene und abgeschwommene Keratinozyten. Diese Art von Keratinozyten zeigen sich kreisrund und im Vergleich zu den anderen Zellen dunkler.

3.3 Anzahl der gezupften Haarfollikel und der Haarfollikel mit ausgewachsenen Keratinozyten

Insgesamt wurden bei allen Versuchen, die zur Beurteilung der morphologischen Varianz, Ort und Zeit des Auswachsens sowie zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten durchgeführt wurden, n= 330 HF untersucht. Eine genaue Beschreibung, wie viele HF bei den jeweiligen Versuchen inkubiert werden und an wie vielen dieser HF Keratinozyten ausgewachsen sind, finden sich im Anhang in **Tabelle 25**.

Es ergaben sich folgende Werte (siehe **Abbildung 19**):

- ➔ Gesamt: 330 HF
- ➔ Davon sind an 159 HF Keratinozyten ausgewachsen (48,2 %)
- ➔ Davon sind 88 HF abgeschwommen (26,7 %)
- ➔ An den restlichen 83 HF konnte kein Auswachsen von Keratinozyten beobachtet werden (25,1 %)

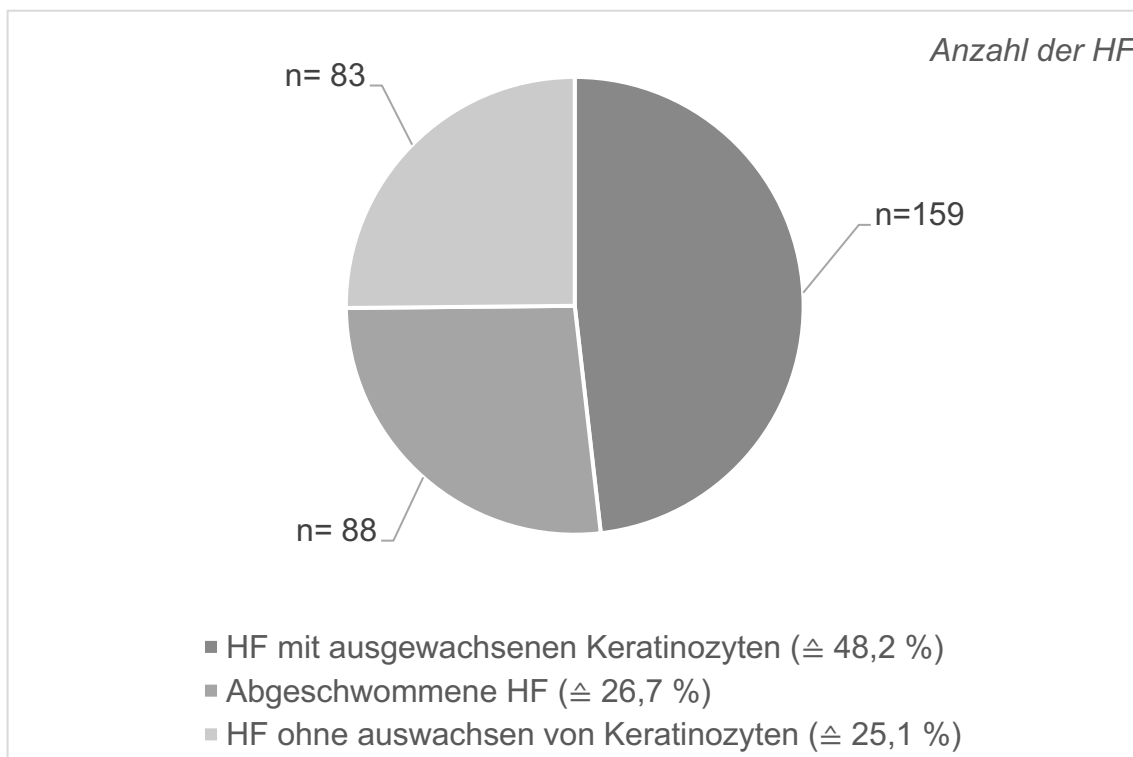


Abbildung 19: Diagramm mit der Anzahl der inkubierten Haarfollikel (HF) n= 330
HF mit ausgewachsenen Keratinozyten; HF, die nach 96 h Inkubation abgeschwommen sind;
HF, an denen keine Keratinozyten ausgewachsen sind

3.4 Morphologische Veränderung der Haarfollikel während der Inkubation

Bei der täglichen mikroskopischen Kontrolle der HF unter dem Mikroskop fiel auf, dass sich diese unter den Standard-Kulturbedingungen (HF-Medium, gefolgt von Keratinozyten-Medium) stark hinsichtlich ihrer Morphologie veränderten. Um diese Veränderungen objektiv zu bewerten, wurde mithilfe des Devices (siehe **Abbildung 11**) eine Quantifizierung der ausplattierten HF durchgeführt. Je analysierter HF wurde mit Hilfe des Devices die Dicke der äußeren Wurzelscheide an jeweils derselben Stelle nach 0, 24, 48, 72 und nach 96 h Inkubation gemessen. Hierfür wurden für alle vier Spender vier unabhängige Versuchsreihen (n= 4) durchgeführt (siehe **2.2.4**).

Ein Beispiel für diese deutliche Veränderung der Morphologie der HF zeigt sich in **Abbildung 20**.

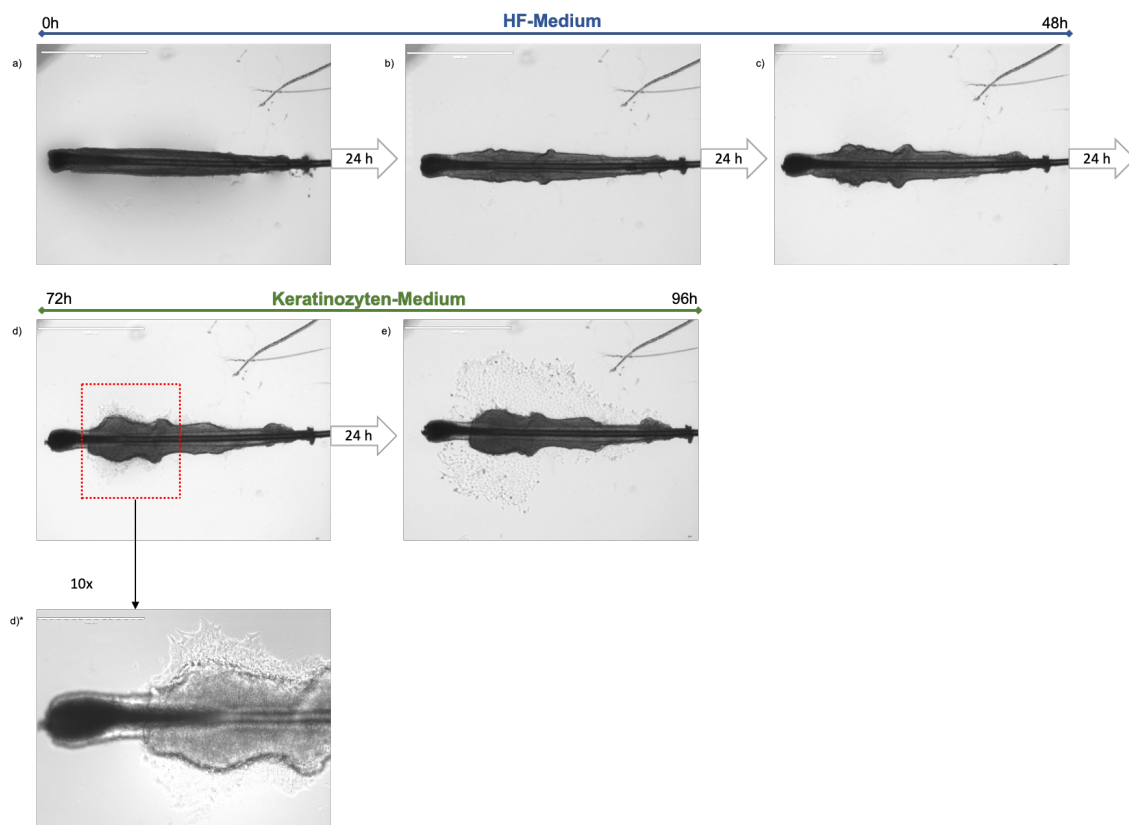


Abbildung 20: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF) während der Inkubation HF in 4facher- Vergrößerung (Maßstab 1000 µm, Bild a) bis e)) und 10facher-Vergrößerung (Maßstab 400 µm, Bild d)*) mit Evos™ Mikroskop fotografiert; Roter Kasten zeigt Bereich des Auswachsens der Keratinozyten, dieser Bereich ist in d)*) vergrößert dargestellt

Es ist deutlich sichtbar, dass sich die äußere Wurzelscheide, die sich am Tag der Extraktion regelmäßig und beinahe geradlinig zeigt, schon nach 24 h Inkubation mit dem Grundmedium stark verändert hat. Nicht nur eine optisch bereits wahrnehmbare Zunahme der Dicke der äußeren Wurzelscheide des HF ist erkennbar, sondern auch eine unregelmäßige „Wellung“ der äußeren Wurzelscheide. Diese Tendenz ist auch nach 48, nach 72 und nach 96 h Inkubation erkennbar. Die äußere Wurzelscheide wird zunehmend dicker und auch unregelmäßiger gewellt. Diese subjektiven Beobachtungen konnten durch Messungen verifiziert werden. Zur Übersicht wurden die gemittelten Werte (Median-Werte) der einzelnen Spender in einem Diagramm dargestellt (siehe **Abbildung 21**). Hierbei ist zu beachten, dass von den vier Spendern jeweils vier Versuchsreihen gestartet wurden und aus jeder Versuchsreihe ein HF ausgewählt wurde für die genauere Analyse.

Bei allen dargestellten Werten handelt es sich um die berechneten relativen Werte der größten Dicke der äußeren Wurzelscheide. Es zeigt sich, dass bei allen untersuchten HF der vier Spender eine Zunahme der Dicke der äußeren Wurzelscheide zu beobachten war. Bereits in den ersten 24 h zeigte sich bei beinahe allen HF eine erste Dickenzunahme, spätestens jedoch nach 48 h, welche über den weiteren Verlauf der Versuche stetig zunahm.

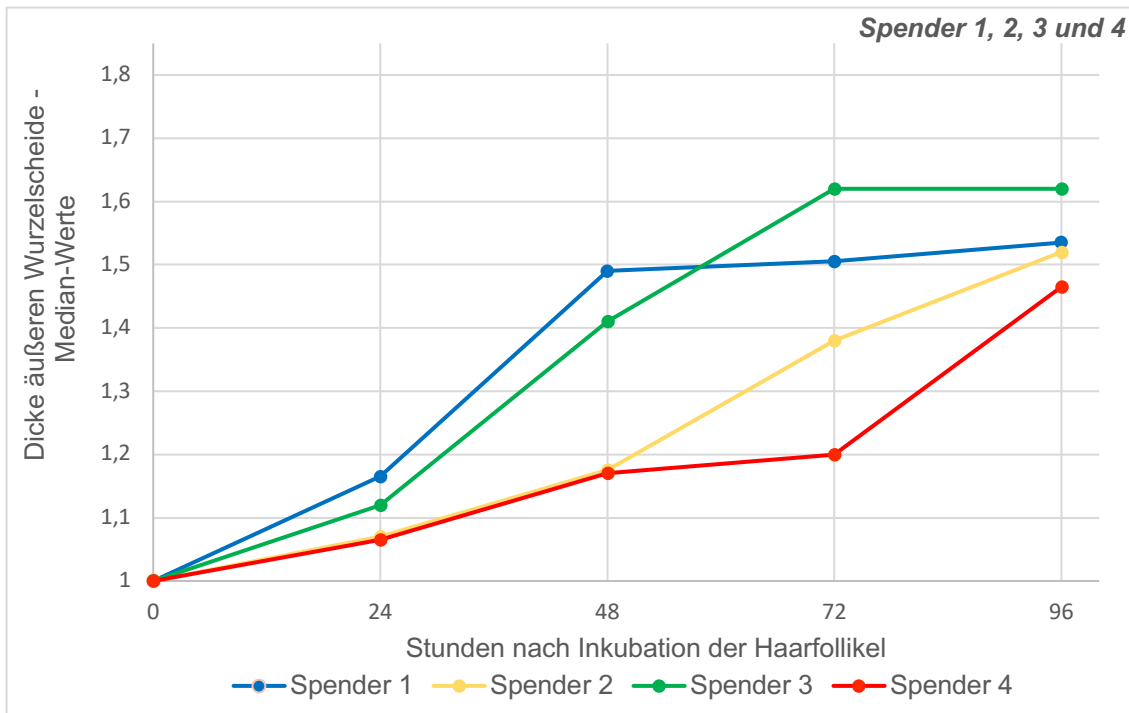


Abbildung 21: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF) – Median-Werte alle Spender (S1, S2, S3 u. S4) zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (Anzahl der Versuchsreihen n= 4)
 x-Achse: Stunden nach Inkubation der HF; y-Achse: relative Werte der Dicke der äußeren Wurzelscheide

Die dazugehörigen Tabellen, in denen auch die absoluten, gemessenen Werten (in mm) neben den relativen Werten der morphologischen Veränderung der HF veranschaulicht werden, finden sich im Anhang (siehe **Tabelle 26** und **Tabelle 27**), ebenso wie die Diagramme zur morphologischen Veränderung der einzelnen Spender (siehe **Abbildung 53** bis **Abbildung 57**).

Als Negativkontrolle zu der oben beschriebenen Versuchsreihe wurde insgesamt je ein weiterer Versuchsdurchlauf für alle Spender gestartet, von welchem je ein HF näher analysiert wurde. Abweichend war die Zugabe von Ampuwa® ohne weitere Zusätze nach der initialen zweistündigen Inkubation (siehe **Abbildung 22**).

So sollte verifiziert werden, dass sowohl das Auswachsen von Keratinozyten als

auch die morphologische Veränderung der HF nur bei Zugabe des HF-Grundmediums mit anschließender Inkubation mit Keratinozyten-Medium stattfindet.

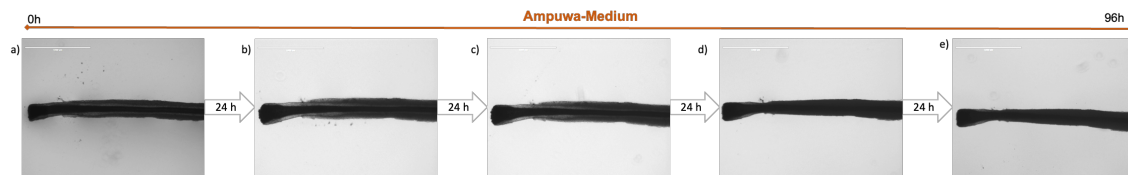


Abbildung 22: Abbildung zur Verdeutlichung der nicht vorhandenen morphologischen Veränderung der Haarfollikel (HF) während der Inkubation mit Ampuwa® über 96 h
HF in 4facher-Vergrößerung (Maßstab 1000 µm) mit Evos™ Mikroskop fotografiert

Sichtbar hier ist, dass sich die Morphologie des HF (im Gegensatz zu den HF aus **Abbildung 20**) kaum verändert, eine Dickenzunahme der äußeren Wurzelscheide ist mit bloßem Auge nicht erkennbar. Des Weiteren konnte bei diesen Versuchsreihen auch kein Auswachsen von Keratinozyten festgestellt werden. Was jedoch zu beobachten war, ist eine „Verdunkelung“ der HF bereits nach 48 bis 72h Inkubation. Eine genaue Differenzierung und Unterscheidung des Haarschafts, der inneren und der äußeren Wurzelscheide war mikroskopisch kaum mehr möglich.

Insgesamt wurden bei dieser Versuchsreihe von den Spendern S1, S2, S3 und S4 n= 20 HF untersucht, je 5 HF pro Spender. Von jedem Spender wiederum wurde ein HF ausgewählt, an dem die Dickenmessung mit Hilfe des Device (siehe **Abbildung 11**) vorgenommen wurde. Die entsprechenden Werte werden im untenstehenden Diagramm konkretisiert (siehe **Abbildung 23**).

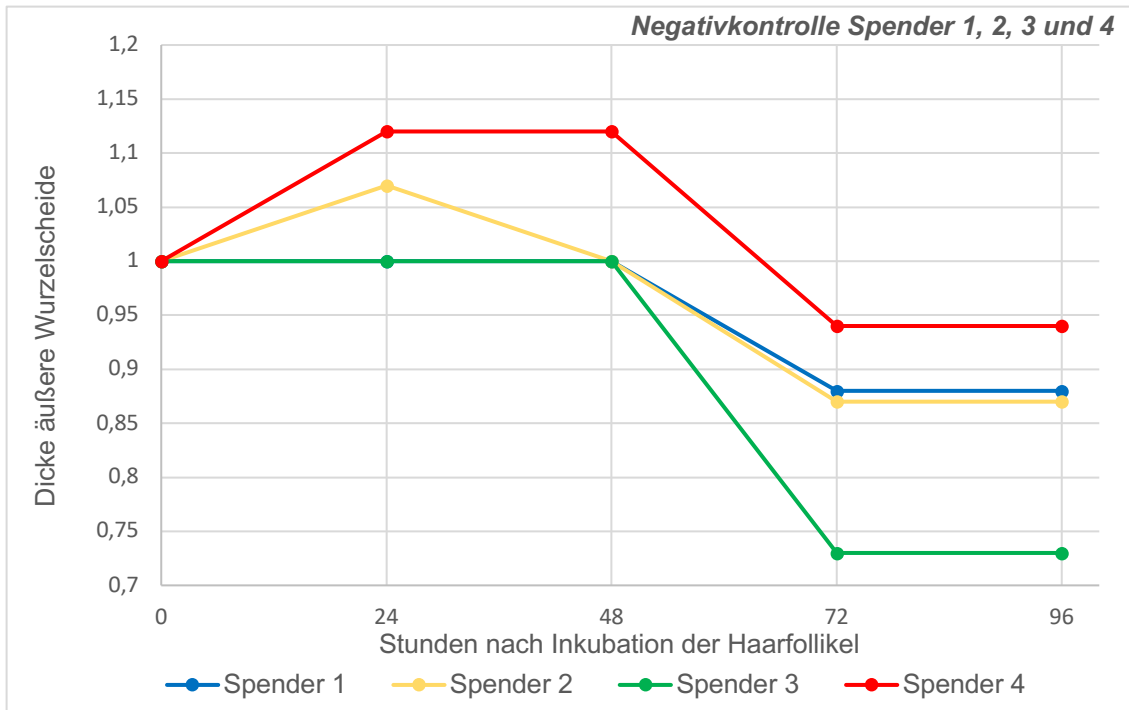


Abbildung 23: Morphologische Veränderung der Haarfollikel (HF) der Spender S1, S2, S3, S4 bei Inkubation mit Ampuwa® als Negativkontrolle (Anzahl der Versuchsreihen n= 1)
 x-Achse: Stunden nach Inkubation der HF; y-Achse: relative Werte der Dicke der äußeren Wurzelscheide

Die Daten in diesem Diagramm bestätigen die Beobachtungen, die mikroskopisch getätigt wurden. Man erkennt simultan zu den mikroskopischen Fotografien, dass nach ca. 48 h die Dicke der HF von allen Spendern abnimmt.

Man sieht also korrespondierend zu der Beobachtung des vermutlichen Absterbeprozesses (zwischen 48 und 72 h Inkubation) die Abnahme der Dicke der Wurzelscheide. Davor findet nur eine sehr geringe oder keine Veränderung der Dicke der äußeren Wurzelscheide statt und somit keine signifikante morphologische Veränderung der HF, vor allem nicht im Vergleich zu der bereits nach 24 h deutlich sichtbaren Veränderung der HF bei Inkubation mit dem HF-Grundmedium (siehe **Abbildung 20** und **Abbildung 21**).

Die dazugehörige Tabelle mit den absoluten gemessenen Werten (in mm) und den relativen Werten der nicht vorhandenen morphologischen Veränderung dieser HF unter Ampuwa® Inkubation findet sich im Anhang (siehe **Tabelle 28**).

3.5 Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten aus gezupften Haarfollikeln

Eine Fragestellung der Dissertation ist es zu klären, welche Zeitspanne vergeht, bis die ersten Keratinozyten unter Verwendung des Standardprotokolls auswachsen (siehe 2.2.3.1). Um diese Frage zu klären, wurden für alle vier Spender sechs unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die ausplattierten HF wurden wieder alle 24 h auf das Erscheinen der ersten Keratinozyten hin mikroskopisch untersucht.

Die Ergebnisse der erhobenen Gesamtdaten zeigten, dass bei sechs Versuchsreihen nach 24 h Inkubation die ersten HF auswachsen (in 25 % der Versuche), bei neun Versuchsreihen nach 48 h Inkubation (in 37,5 % der Versuche), bei acht Versuchsreihen nach 72 h Inkubation (in 33,33 % der Versuche) und bei einer Versuchsreihe nach 96 h Inkubation (in 4,17% der Versuche). Dargestellt ist dies in **Tabelle 19**, illustriert in **Abbildung 24**.

Tabelle 19: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Verwendung des Standardprotokolls

Anzahl der Versuchsreihen inkl. Prozentsatz, bei denen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach 24, 48, 72 o. 96 h Inkubation Keratinozyten ausgewachsen sind

Zeit (in h)	Anzahl der Versuchsreihen (n=)	Prozentsatz (%)
24	6	25
48	9	37,5
72	8	33,33
96	1	4,17

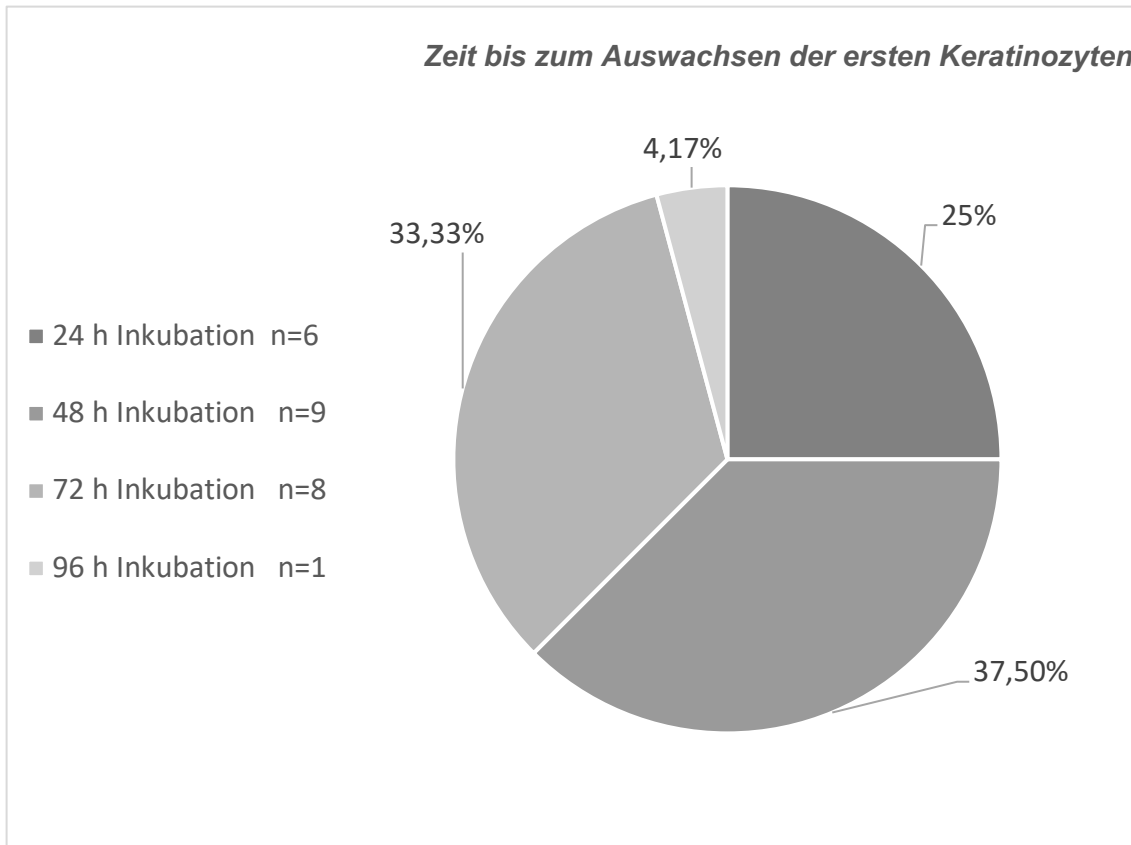


Abbildung 24: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Standardbedingungen (HF-Medium) – alle Versuchsreihen

Anzahl der Versuchsreihen (n= 24); inkl. Prozentsatz, bei denen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach 24, 48, 72 oder 96 h Inkubation Keratinozyten ausgewachsen sind

Daraus lässt sich schließen, dass die ersten Keratinozyten im Durchschnitt nach 48 h Inkubation mit dem Grundmedium auswachsen. Schaut man sich bei den vier Spendern die Werte nach der Geschlechterverteilung an, so zeigt sich, dass der Median-Wert der männlichen Spender mit 48 h deutlich unter dem Median-Wert der weiblichen Spender mit 60 h lag. Die Median-Werte der einzelnen Spender lagen bei 48 h (S1, S2 und S4) und bei 72 h (S3) (siehe **Abbildung 25**).

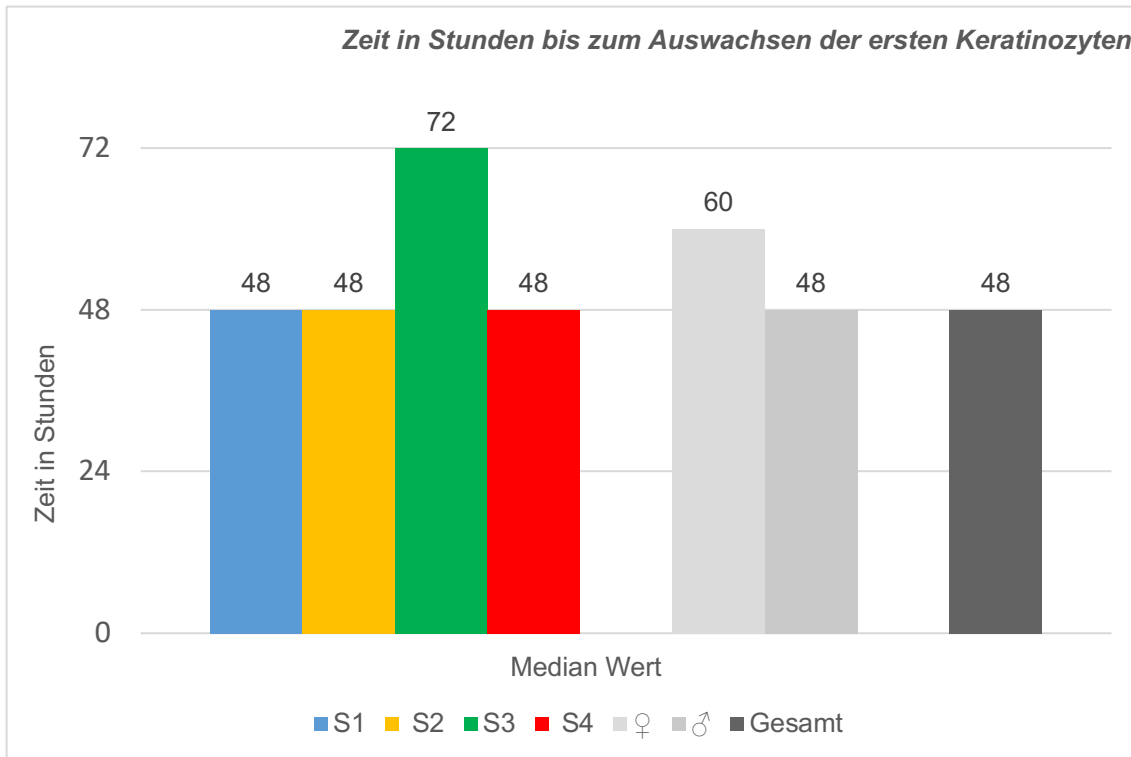


Abbildung 25: Zeit in Stunden bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten der Spender S1, S2, S3 und S4 (Median-Werte) inkl. der Median-Werte der männlichen und weiblichen Spender sowie der Gesamt-Median-Wert; y-Achse: Zeit in Stunden

In unseren Versuchsreihen war zu erkennen, dass bei den männlichen Spendern das Auswachsen von ersten Keratinozyten schneller registriert werden konnte als bei den weiblichen Spendern. Zur Vervollständigung und Verdeutlichung finden sich im Anhang sowohl Diagramme (siehe **Abbildung 58** bis **Abbildung 60**) als auch eine Tabelle (siehe **Tabelle 29**), in der die einzelnen Auswachszeitpunkte für jede Versuchsreihe der vier Spender inklusive der berechneten Median-Werte genau aufgelistet sind.

3.6 Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln

Eine weitere Fragestellung innerhalb dieser Dissertation war, an welchem Ort der inkubierten HF die ersten Keratinozyten auswachsen. Für die Beantwortung dieser Frage wurde das selbstdesignte Device (siehe **Abbildung 7** und **Abbildung 26**) zur Hilfe genommen.

Das Device hat eine Länge von 0,3 cm = 3 mm bei einer Punktstärke von 0,25 Pt und ist aufgeteilt in 3 Teile. Der erste Teil beträgt 1/5 der gesamten Länge (also 0,6 mm), der zweite und dritte Teil je 2/5 der gesamten Länge (also je 1,2 mm).

Zur besseren Übersicht und für das bessere Verständnis im Verlauf dieser Ausführungen wurde das Device in **Abbildung 26** erneut aufgeführt, sowohl in der Originalgröße (links) und in 25-facher Vergrößerung (rechts).

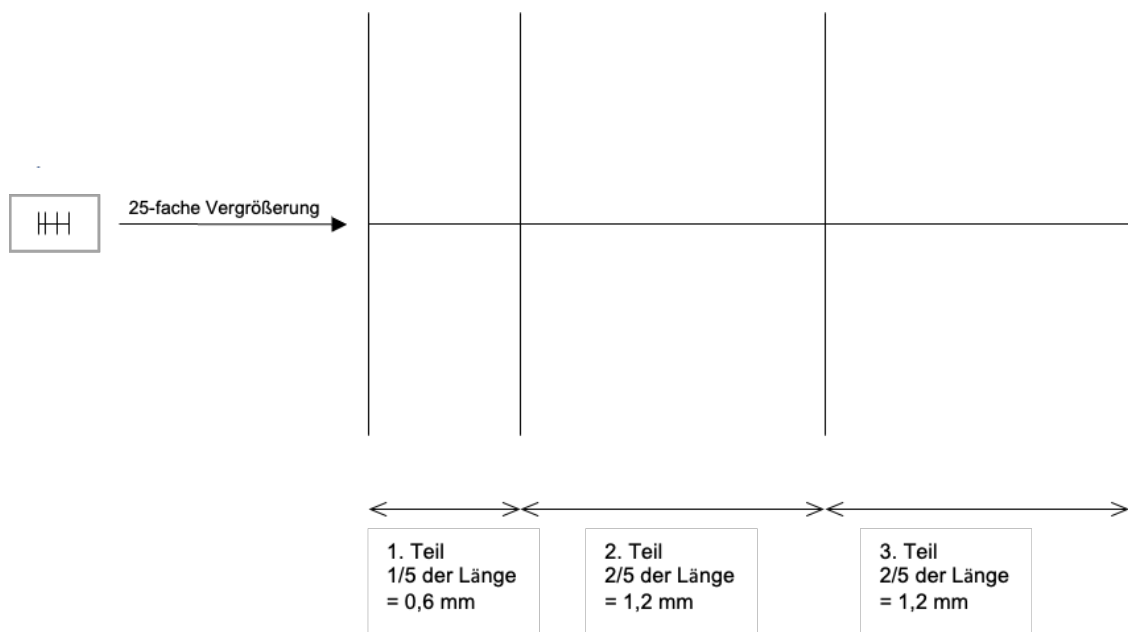


Abbildung 26: Verwendetes Device zur Bestimmung des Ortes, an dem die ersten Keratinozyten an den inkubierten Haarfollikeln auswachsen

Links: Device in Originalgröße (Länge: 3 mm); rechts: Device in 25-facher Vergrößerung inkl. Beschriftung

Um festzustellen an welchem Ort der HF die ersten Keratinozyten auswachsen, wurde das Device auf eine Folie gedruckt, die beim Mikroskopieren mit dem Evos™ Mikroskop unter die T25-Fläschchen gelegt wurde. Nun wurden die HF

so platziert, dass bei der Betrachtung unter dem Mikroskop die dermale Papille des jeweiligen HF die erste senkrechte Linie des Device berührt. So wurden die jeweiligen Fotografien aufgenommen, und beim ersten Auswachsen der Keratinozyten konnte notiert werden, ob diese im 1., 2. oder 3. Teil des Device ausgewachsen sind. Insgesamt wurden von den vier Spendern 36 HF untersucht, jeweils neun HF pro Spender. Eine Tabelle, in der alle 36 HF mit dem jeweiligen Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten beschrieben werden, findet sich im Anhang (siehe **Tabelle 30**).

Nach Analyse der vorliegenden Daten zeigte sich, dass bei den insgesamt 36 untersuchten HF bei einem HF die ersten Keratinozyten im Bereich des 1. Teil des Device auswachsen ($\cong 2,78\%$), bei 29 HF die ersten Keratinozyten im Bereich des 2. Teil des Device auswachsen ($\cong 80,55\%$) und bei sechs HF die ersten Keratinozyten im Bereich des 3. Teil des Device auswachsen ($\cong 16,67\%$), siehe **Abbildung 27**.

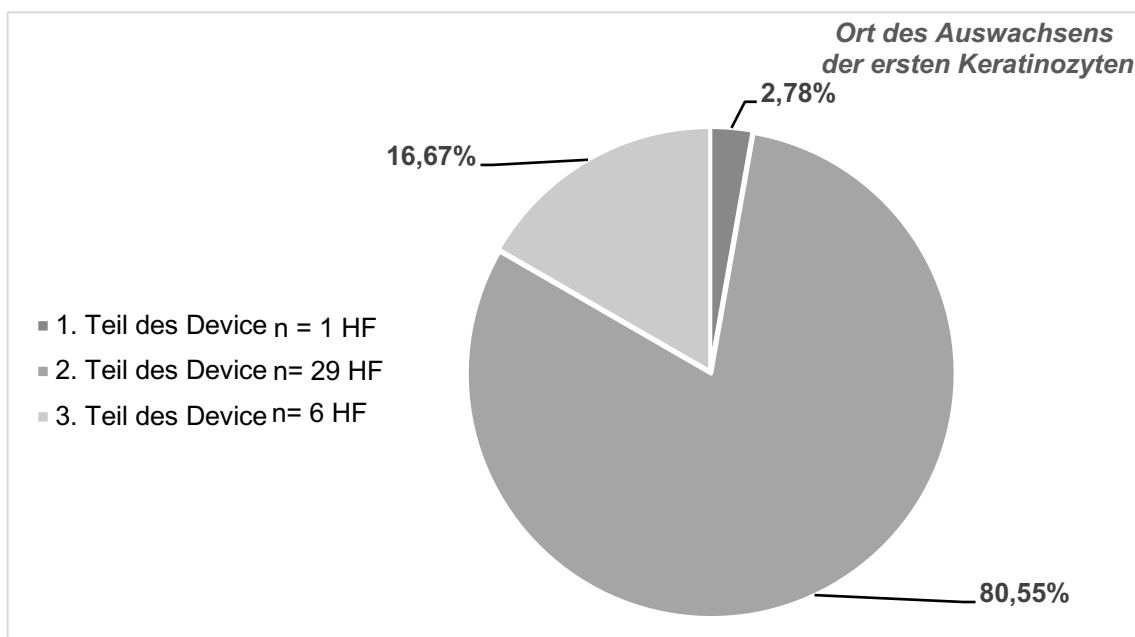


Abbildung 27: Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten in Bezug auf das Device – prozentualer Anteil u. Anzahl der Haarfollikel (HF); n= Anzahl der HF

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei über 80 % der untersuchten HF das erste Auswachsen von Keratinozyten im Bereich des 2. Teils des Device beobachtet werden konnte.

Ein Beispiel hierfür zeigt sich im nachfolgenden Bild, in welchem ein HF fotografisch dokumentiert wurde, bei dem nach 24 h Inkubation im Bereich des 2. Teils des Devices erste Keratinozyten ausgewachsen waren.



Abbildung 28: Haarfollikel nach 24 h Inkubation unter Normalbedingungen; Keratinozyten-Wachstum im Bereich des 2. Teils des Device

Rotes Rechteck zeigt den Bereich des Keratinozyten-Wachstums;

Device in grau eingefügt zur Verdeutlichung der Linien.

Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000 µm mit Device

An diesem beispielhaft verwendeten HF in **Abbildung 28** zeigt sich die charakteristische Stelle für das Auswachsen der ersten Keratinozyten im Bereich des 2. Teils des Device. Kennzeichnend für die HF, bei denen die Keratinozyten im 2. Teil des Device auswachsen, war, dass die Zellen meist im Bereich des vorderen Teils der äußere Wurzelscheide erscheinen. Dabei handelt es sich um den

Ort, wo der Haarschaft erstmals von innerer und äußerer Wurzelscheide ummantelt ist; diese Strecke betrug bei diesem HF eine ungefähre Länge von 0,073 cm ($\pm 730 \mu\text{m}$).

Exemplarisch für die 6 HF, bei denen Keratinozyten im 3. Teil des Devices ausgewachsen, kann man in **Abbildung 29** beispielhaft die ausgewachsenen Keratinozyten im hintersten Teil der äußeren Wurzelscheide erkennen.

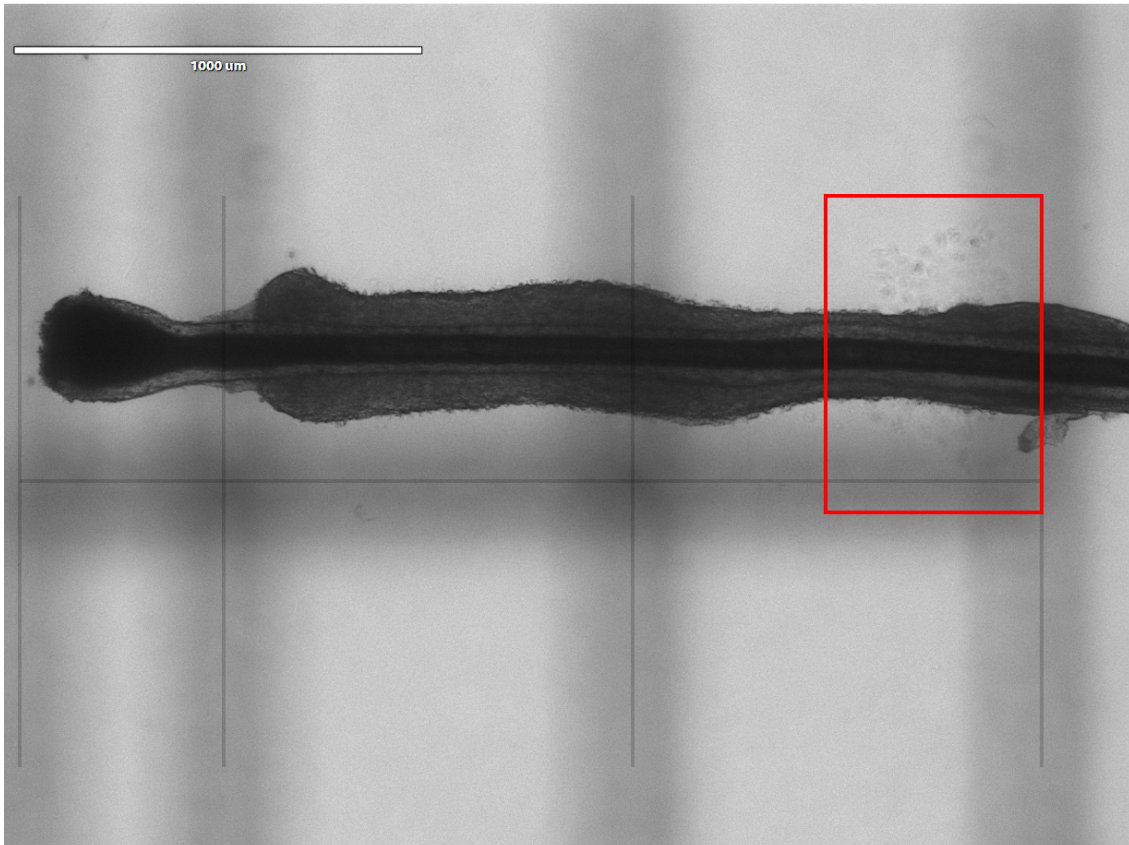


Abbildung 29: Haarfollikel nach 96 h Inkubation; Keratinozyten- Wachstum im Bereich des 3. Teils des Device

Rotes Rechteck zeigt den Bereich des Keratinozyten-Wachstums;

Device in grau eingefügt zur Verdeutlichung der Linien.

Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000 μm mit Device

3.7 Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln

Da in den Versuchen mit dem Standardprotokoll die Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten zwischen 24 bis 96 h betrug, wurde eine neue Versuchsreihe gestartet mit dem Ziel, die Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den HF zu verkürzen. Ziel hiervon ist es, für zukünftig Forschende den Generierungsprozess der Keratinozyten zu vereinfachen und zu beschleunigen, um so auch den gesamten Prozess der Generierung von iPSZ aus diesen Keratinozyten zu beschleunigen.

Für diesen Zweck wurde dem Standardprotokoll verschiedene Zellkulturzusätze (siehe **Tabelle 20**) hinzugefügt. Das Medium der ausplattierten HF wurde erstmals nach 48 h Inkubation gewechselt, die HF wurden entweder weiter mit dem HF-Medium inklusive der jeweiligen Zellkulturzusätzen inkubiert oder das Medium wurde auf das Keratinozyten-Medium gewechselt, sobald das Auswachsen von Keratinozyten zu beobachten war.

Insgesamt wurden für die Analyse der Versuchsreihe zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten 144 HF analysiert, wobei je Spender sechs unabhängige Versuchsreihen mit je fünf Zellkulturzusätzen und eine Kontrolle ohne jegliche Zellkulturzusätze untersucht wurden. Für jeden Zellkulturzusatz wurden demnach 24 unabhängige Haarfollikel untersucht.

Tabelle 20: Zellkulturzusätze mit Endkonzentrationen, die verwendet wurden, in der Versuchsreihe: Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten

Zellkulturzusatz	Endkonzentrationen
A83-01	10 μ M
DAPT	10 μ M
EGF	20 ng/ml
IGF-1	20 ng/ml
SB431542	10 μ M
Kontrolle (MEF)	Ohne Zugabe von Zellkulturzusätzen

Für alle durchgeführten Versuche findet sich im Anhang eine Tabelle (siehe **Tabelle 31**), in der für jeden HF mit dem jeweiligen Zellkulturzusatz der genaue Auswuchszeitpunkt aufgeführt ist. Zusätzlich finden sich im Anhang auch Abbildungen mit den Median-Werten der einzelnen Zellkulturzusätze für jeden Spender (siehe **Abbildung 61** bis **Abbildung 64**).

Zur Verdeutlichung wurden im untenstehenden Diagramm die Gesamt-Median-Werte aller Spender im Hinblick auf die in der Tabelle aufgelisteten Zellkulturzusätze und der Verwendung von 1,5 ml MEF als Kontrollversuchsgruppe illustriert. Zusätzlich ist der SEM (Standard Error of the Mean) eingefügt, sowie die mit dem TTEST berechneten Signifikanzen verdeutlicht.

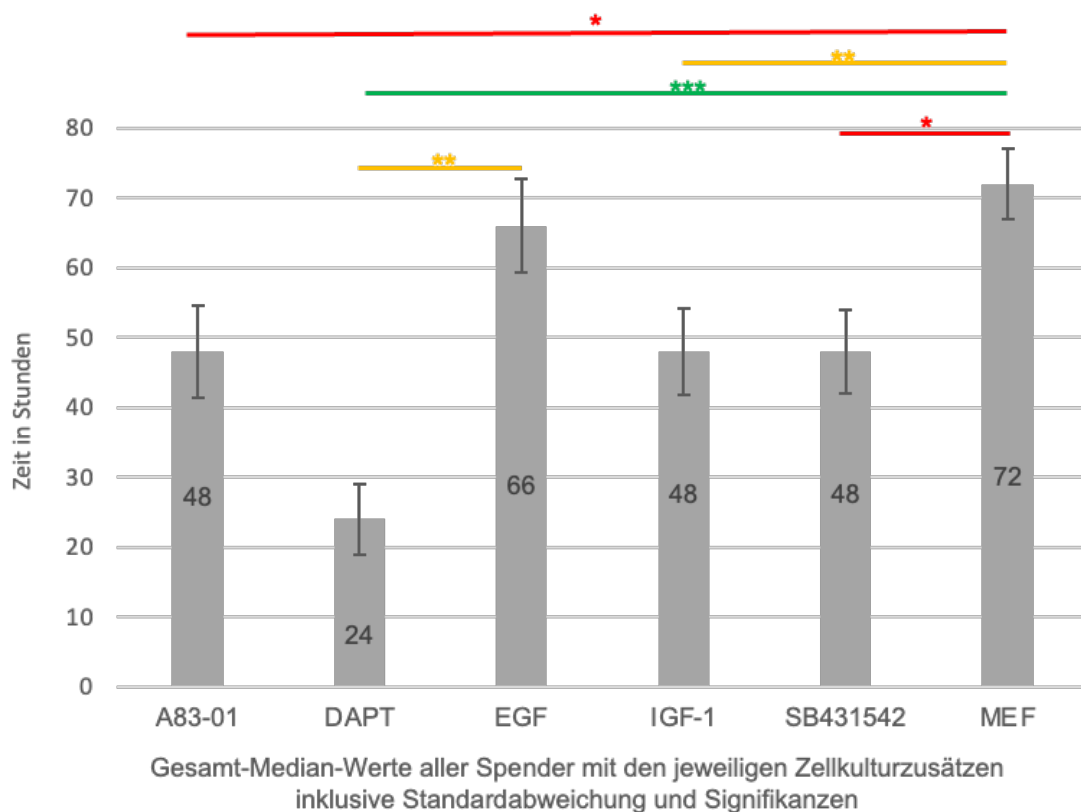


Abbildung 30: Gesamt-Median-Werte aller Spender im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze und der MEF-Kontrollgruppe zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten + SEM (Standard Error of the Mean); TTEST $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***

x-Achse: verwendete Zellkulturzusätze; y-Achse: Zeit in Stunden (Anzahl der HF pro Zusatz $n=24$)

Bei der Analyse der erhobenen Daten konnten folgende Rückschlüsse gezogen werden:

Bei der Verwendung des Zellkulturzusatzes **A83-01** (= TGF- β type I-Inhibitor) konnte keine Reduzierung der Zeitspanne beobachtet werden. Die Werte für das Auswachsen der ersten Keratinozyten variieren von 24 h bis 96 h, wobei jedoch zu beobachten ist, dass sich auch die berechneten Median-Werte innerhalb der Spender recht inhomogen darstellen (S1: 48 h, S2: 24 h, S3: 96 h und S4: 60 h). Im Vergleich zu den Median-Werten unter Normalbedingungen zeigte sich nur bei S2 eine Verbesserung, bei den übrigen Spendern zeigte sich eher sogar eine Verschlechterung oder gleichbleibende Werte.

Bei der Zugabe von **SB431542** (= TGF- β receptor kinase inhibitor) als Zellkulturzusatz lagen die Median-Werte der Spender S1, S2 und S4 je bei 48 h, was dem gleichen Wert unter Standardbedingungen entspricht. Somit konnte keine Veränderung der Zeitspanne beobachtet werden. Bei Spender S3 konnte kein Auswachsen von Keratinozyten während der 96-stündigen Inkubation beobachtet werden. Alle HF sind entweder abgeschwommen oder es sind keine Keratinozyten ausgewachsen. Das Fazit für die Verwendung von SB431542 als Zellkulturzusatz lautet somit ebenfalls, dass keine Reduzierung der Zeitspanne festgestellt werden konnte, bei Spender S3 hatten sich die Bedingungen für das Auswachsen von Keratinozyten sogar verschlechtert.

Nach Applikation des Zellkulturzusatzes **EGF** (= epidermaler Wachstumsfaktor) waren die gemessenen Zeitpunkte innerhalb der Spender inhomogen. Auch wenn bei Spender S4 an vier der sechs inkubierten HF die ersten Keratinozyten bereits nach 24 h auswachsen, konnte dieser Trend für die anderen Spender nicht bestätigt werden. Die Werte der anderen Spender variieren zwischen 48 h und 96 h, wodurch der Zusatz von EGF ins Medium keine Reduzierung der Zeitspanne zur Folge hatte.

Bei der Nutzung des Zellkulturzusatzes **IGF-1** (=Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1) stellen sich die Daten ebenfalls unregelmäßig dar.

Bei den Spendern S1 und S4 (männliche Spender) liegen die Median Werte bei jeweils 48 h. Bei Spender S2 liegt der Median-Wert bei nur 24 h, da zu diesem

Zeitpunkt an vier der sechs HF die ersten Keratinozyten bereits ausgewachsen sind. Besonders auffallend sind die Messergebnisse des weiblichen Spenders 3. Hier konnte ebenso wie bei der Zugabe von SB431542 keine Zeitpunkte erhoben werden, da alle untersuchten HF entweder abgeschwommen sind oder kein Auswachsen von Keratinozyten beobachtet werden konnte. Insgesamt lässt sich sagen, dass der Zusatz von IGF-1 für drei von vier Spendern gute Werte im Vergleich zu der Standardbedingung erzielte. Zusammenfassend konnte jedoch auch hier keine homogene Verbesserung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Zellen festgestellt werden.

Als **Negativkontrolle** wurde eine Versuchsreihe mit HF-Medium ohne Zellkulturzusätze durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte beobachtet werden, dass bei 10 von 24 getesteten HF (ca. 42 %) Keratinozyten auswachsen, selbst wenn diese nur in reinem HF-Grundmedium inkubiert wurden. Bei drei von vier Spendern änderte sich der Wert nicht im Vergleich zur Normalbedingung (HF-Medium mit den Zusätzen von FGF2 und Y27632), bei Spender 1 verschlechterte sich der Wert von 48 h unter Normalbedingung auf 72 h bei Inkubation in reinem Grundmedium.

Bei der Zugabe des Zellkulturzusatzes **DAPT** (= Notch-Inhibitor) hingegen konnte bei allen Spendern eine Erniedrigung des Median-Werts im Vergleich zur Negativkontrolle und auch den Median-Werten unter Inkubation mit dem HF-Medium beobachtet werden. Die Median-Werte der Spender lagen bei der Verwendung von DAPT als Zusatz bei allen vier Spendern bei 24 h. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass unter dieser Bedingung in vielen Versuchsreihen die ersten Keratinozyten bereits nach 24 h Inkubation ausgewachsen sind. Beeindruckend ist, dass von den insgesamt 24 mit DAPT inkubierten HF Keratinozyten an 19 HF ausgewachsen sind, was einem Auswachserfolg von 79,17 % entspricht. Zum Vergleich wurde ein durchschnittlicher Erfolg des Auswachsens bei der Inkubation mit dem HF-Medium in dieser Arbeit von 47,5 % erreicht. Die verbleibenden 5 HF dieser Versuchsreihe sind entweder gar nicht ausgewachsen oder vorzeitig abgeschwommen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Zugabe von 10 μ M DAPT zum einen der Erfolg auf ein generelles Auswachsen der Keratinozyten erhöht wurde und zum anderen die Zeitspanne bis zum Auswachsen

der ersten Keratinozyten signifikant ($p = 0,00014$) ebenfalls reduziert werden konnte. Besonders zu beachten ist hierbei, dass bei dem weiblichen Spender S3, der unter Normalbedingungen den höchsten Median-Wert von 72 h aufweist, also unter allen gemessenen Spendern die längste Zeit brauchte, bis aus den HF die ersten Keratinozyten auswachsen, unter Zugabe von DAPT einen Wert von 24 h erreichte. Damit konnte eine Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten bei Spender 3 um 33 % erreicht werden.

3.8 Immunfluoreszenzfärbungen (Kryostat-Schnitte) und Genexpressionsanalyse der Haarfollikel

3.8.1 Immunfluoreszenzfärbung der Haarfollikel in Kryostat-Schnitten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die Zeit und der Ort des ersten Auswachsens von Keratinozyten an gezupften HF untersucht. Mit Hilfe von immunologischen Färbungen und quantitativen RNA-Analysen von Keratinen (K5, K10, K14, K19) soll im Weiteren die bestimmte Zellschicht oder Zellpopulation innerhalb des HF analysiert werden, aus der möglicherweise diese ersten Keratinozyten auswachsen können.

Gefärbt wurden Kryostat-Längsschnitte von HF des Spenders S5 mit den unten aufgeführten Keratinen.

Hinsichtlich der Expression der Keratine K5, K10, K14 und K19 konnte festgestellt werden, dass bei den Immunfluoreszenzfärbungen lediglich die Keratine 5 und 14 in den HF ein positives Signal zeigten, verdeutlicht in den untenstehenden Bildern.

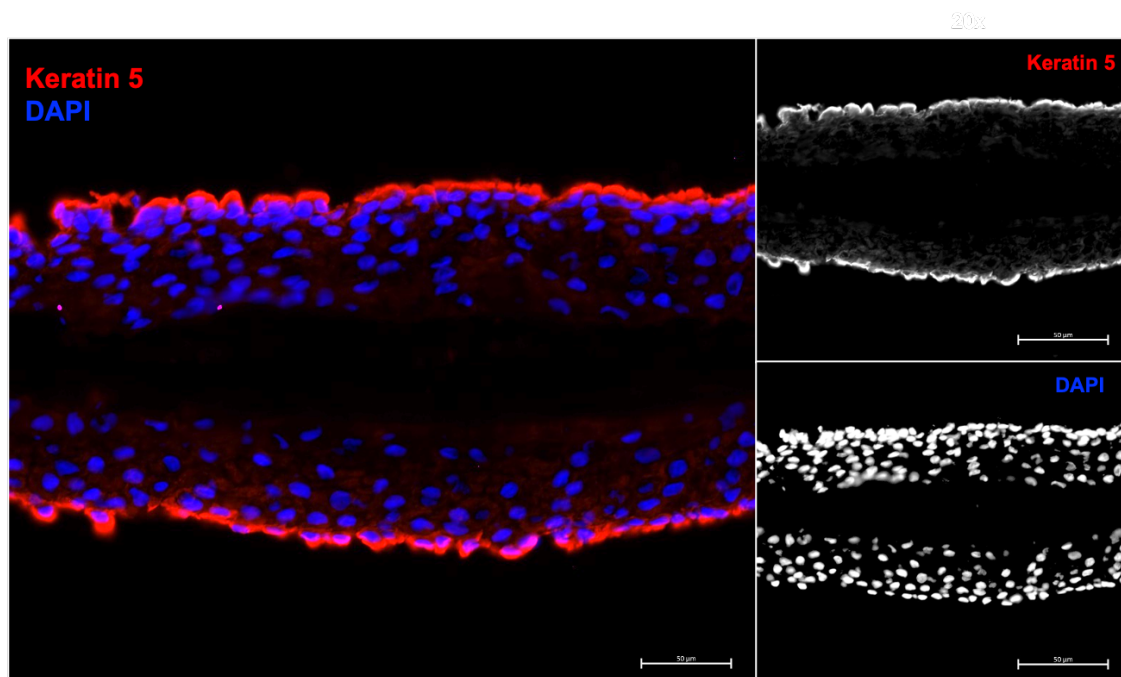


Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung eines Haarfollikels (HF) von Spender S5 mit Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)

Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

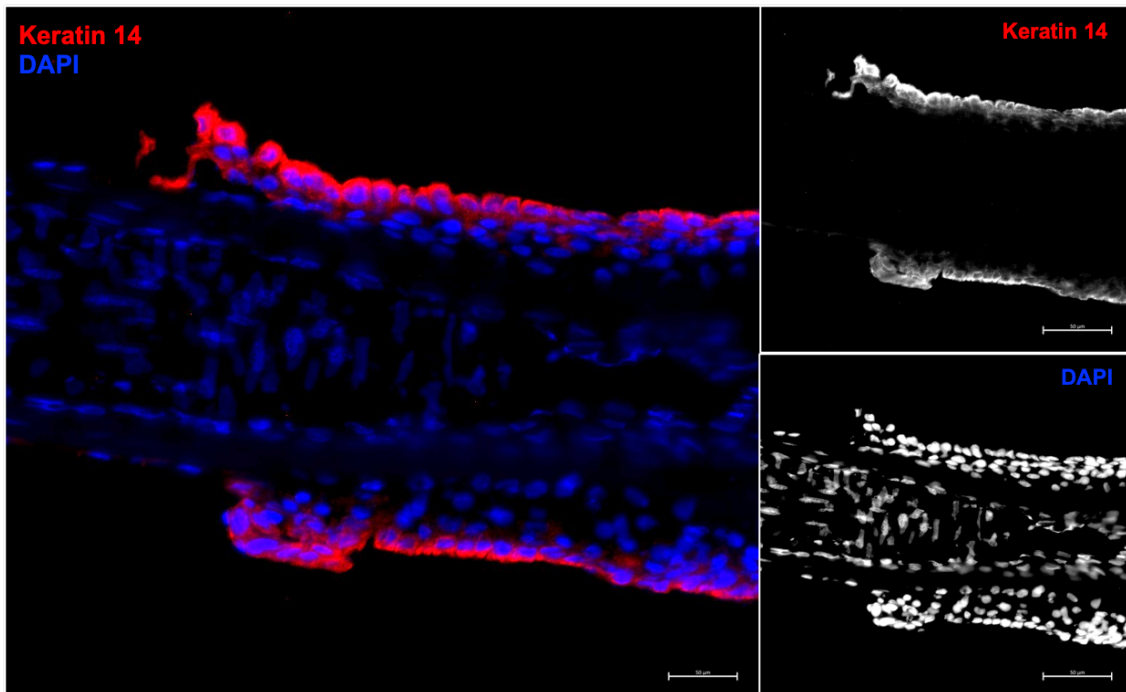


Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung eines Haarfollikels (HF) von Spender S5 mit Keratin 14 (rot) und DAPI (blau)
 Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

In **Tabelle 21** ist die Expression der Keratine in den HF zusammengefasst:

Tabelle 21: Auflistung der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Keratine (absteigend nach ihrem Molekulargewicht in kDa) und deren Exprimierung in den Haarfollikeln (HF) des Spenders S5

Protein	Exprimierung in den HF
K10	Nicht exprimiert
K5	Exprimiert
K14	Exprimiert
K19	Nicht exprimiert

3.8.2 Genexpressionsanalyse der Haarfollikel

Für die Keratine 5, 10, 14 und 19 wurde eine Genexpressionsanalyse der HF des Spenders S5 (n=3) durchgeführt:

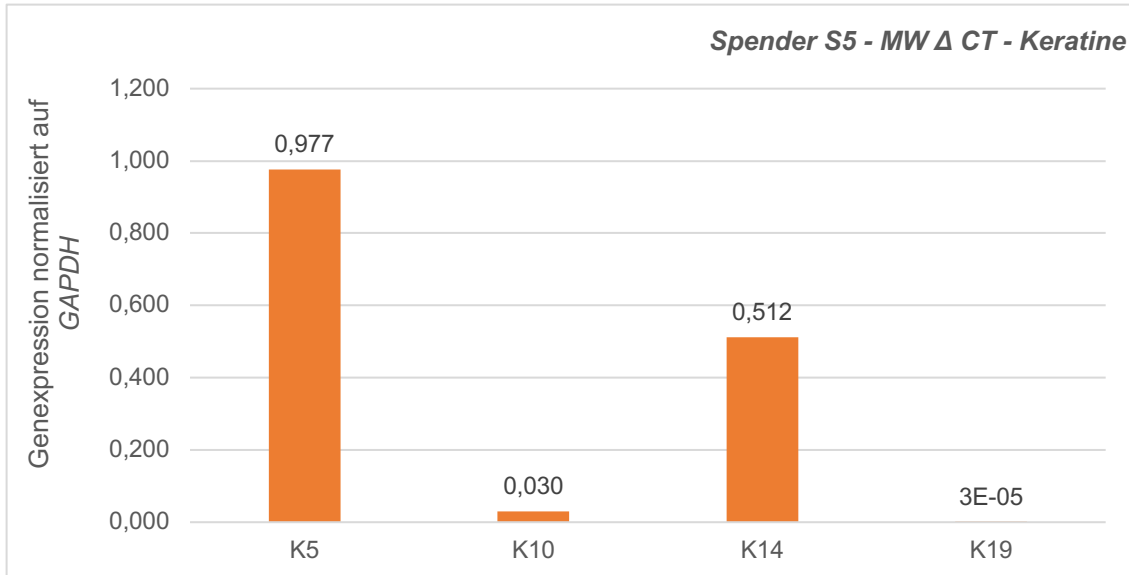


Abbildung 33: Relative Genexpression der Keratine (K 5, 10, 14, 19) in den Haarfollikeln (HF) von Spender S5 normalisiert auf GAPDH – relative Quantifizierung (Anzahl der Proben n=3)

Internes Housekeeping-Gen GAPDH; Zahlen auf drei Nachkommastellen gerundet

Sichtbar ist, dass in den HF des Spenders die Keratine 5 und 14 eine deutliche Expression zeigen, mit der höchsten Expression bei Keratin 5. Keratin 10 hingegen weist einen um beinahe 32fach geringeren Wert auf als Keratin 5, der Wert von Keratin 19 ist der niedrigste von allen gemessenen Proben.

Diese Ergebnisse spiegeln auch die Immunfluoreszenzfärbungen wider: Keratin 5 und Keratin 14 konnten in den HF mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, Keratin 10 und Keratin 19 hingegen nicht.

3.9 Immunfluoreszenzfärbungen der ausgewachsenen Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln und Genexpressionsanalyse der Keratinozyten

3.9.1 Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten an den gezupften Haarfollikeln

Im Rahmen dieser Dissertation wurden bereits die Ergebnisse zu den morphologischen Veränderungen, dem Zeitpunkt und des Ortes des Auswachsens gezeigt. Im Weiteren folgt die detaillierte Analyse der HF und der an ihnen ausgewachsenen Keratinozyten (welche später zu iPSZ reprogrammiert werden können) mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und Genexpressionsanalysen.

Im Rahmen der Doppeldeckgläserversuche wurden die ausgewachsenen Keratinozyten an den inkubierten HF von Spender S3 und Spender S4 untersucht, fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Die Keratinozyten inkl. der HF wurden, wie im Protokoll unter 2.2.3.4.1 beschrieben, fixiert und dann mittels des Färbeprotokolls für Zellkulturen (siehe 2.2.3.4.2) gefärbt.

Im Folgenden sollen nun anhand von verschiedenen Bildern, welche alle mit dem PrimoVert Axio Imager M2 Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe der AxioVision 4.8.1. Software bearbeitet wurden, die Expressionsmuster der Keratine 1, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 25, 5, 6 und (6/)/75 gezeigt werden.

Zuerst werden die Bilder mit den doppeltpositiven Färbungen gezeigt, nachfolgend die Fotografien mit nur einem positiv gefärbten Keratin.

Bei der Färbung von Keratin 5 (grün) mit Keratin 15 (rot) (siehe **Abbildung 34**) zeigte sich, dass beide Keratine in den ersten auswachsenden Keratinozyten an den HF exprimiert sind. Eine Besonderheit hierbei war, dass alle ausgewachsenen Keratinozyten Keratin 5 exprimierten, jedoch waren nicht alle Zellen doppelpositiv für Keratin 5 und Keratin 15. Einige der Keratinozyten zeigten nur eine Expression von Keratin 5 (siehe gelbe Markierung in **Abbildung 34**).

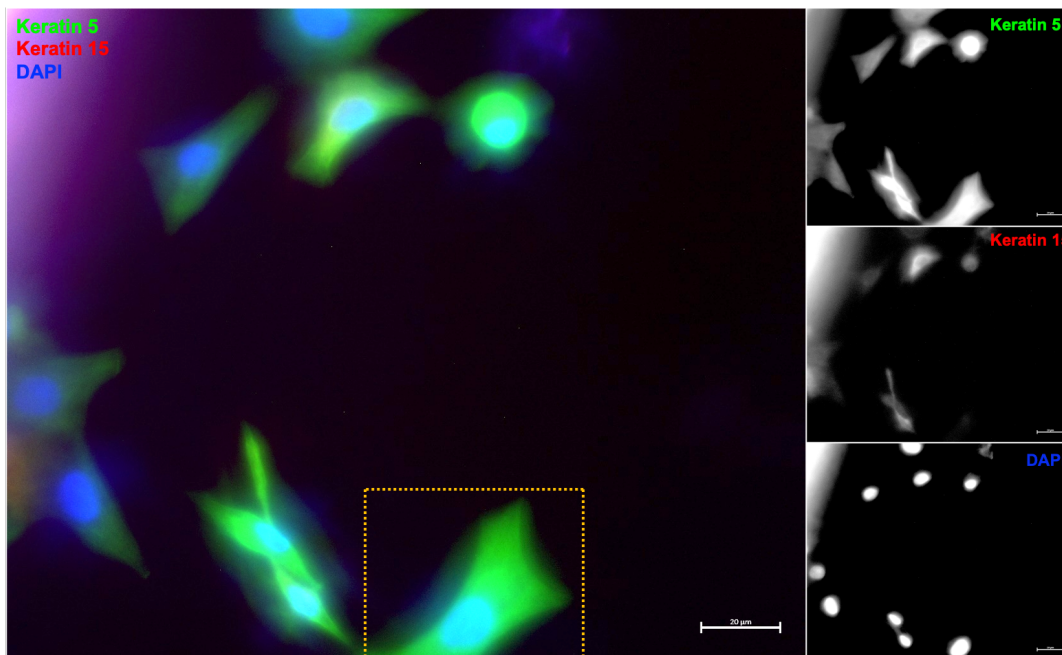


Abbildung 34: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 5 (grün), Keratin 15 (rot) und DAPI (blau)

Alle mikroskopierten Keratinozyten sind Keratin 5 positiv, einige Keratinozyten sind gleichzeitig Keratin 5 u. Keratin 15 positiv; einige Keratinozyten sind nur Keratin 5 positiv (siehe gelbe Markierung);

Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 40-facher Vergrößerung, Maßstab 20µm

Auch die Keratine 6 (grün) und 5 (rot) wurden auf die Expression in den ausgewachsenen Keratinozyten getestet. In der mikroskopischen Aufnahme (siehe **Abbildung 35**) konnte gezeigt werden, dass neben Keratin 5 auch das Keratin 6 in den ersten auswachsenden Keratinozyten exprimiert ist.

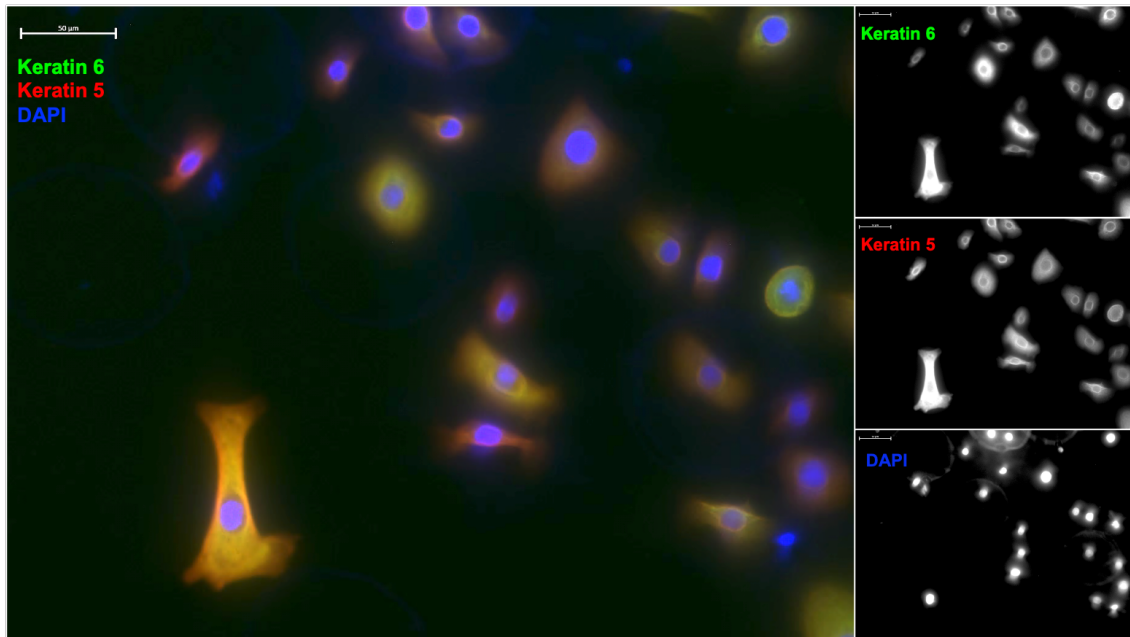


Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 6 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)
Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

Auch Keratin 6/75 (grün) wurde mit Keratin 5 (rot) ko-gefärbt.

In der mikroskopischen Aufnahme (siehe **Abbildung 36**) konnte verifiziert werden, dass auch Keratin 75, zusätzlich zu Keratin 6 und Keratin 5 in den ersten auswachsenden Keratinozyten exprimiert ist und immunhistochemisch gefärbt werden kann.

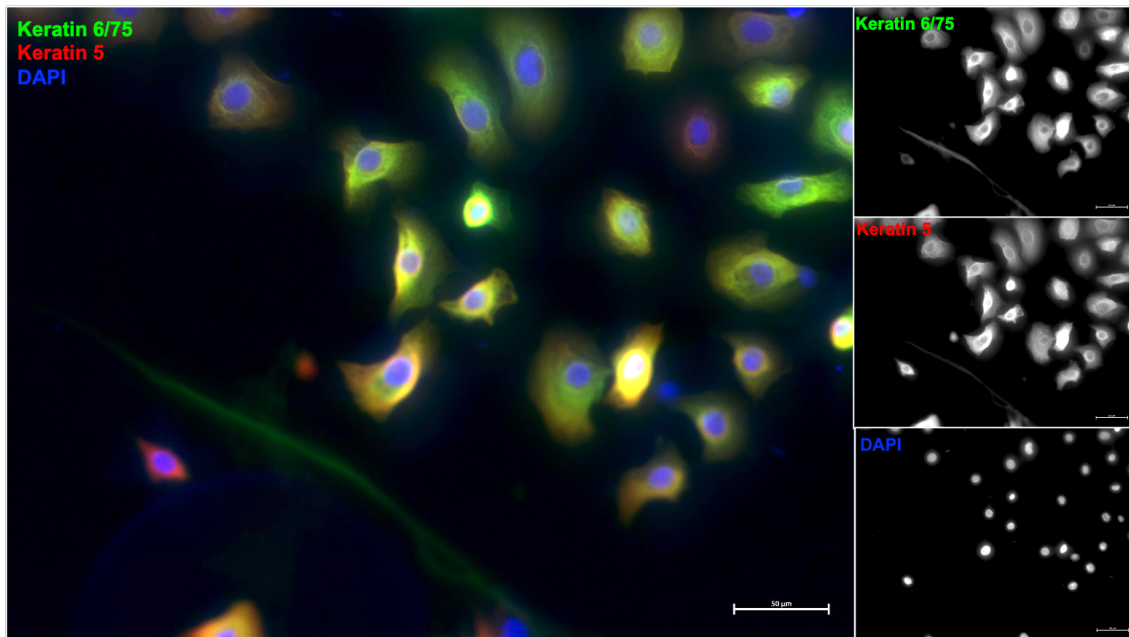


Abbildung 36: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 6/75 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)
Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

Bei Färbung mit Keratin 17 (grün) zusätzlich zur Färbung von Keratin 5 (rot) zeigte sich Keratin 17 positiv, ebenso wie Keratin 5 (siehe **Abbildung 37**).

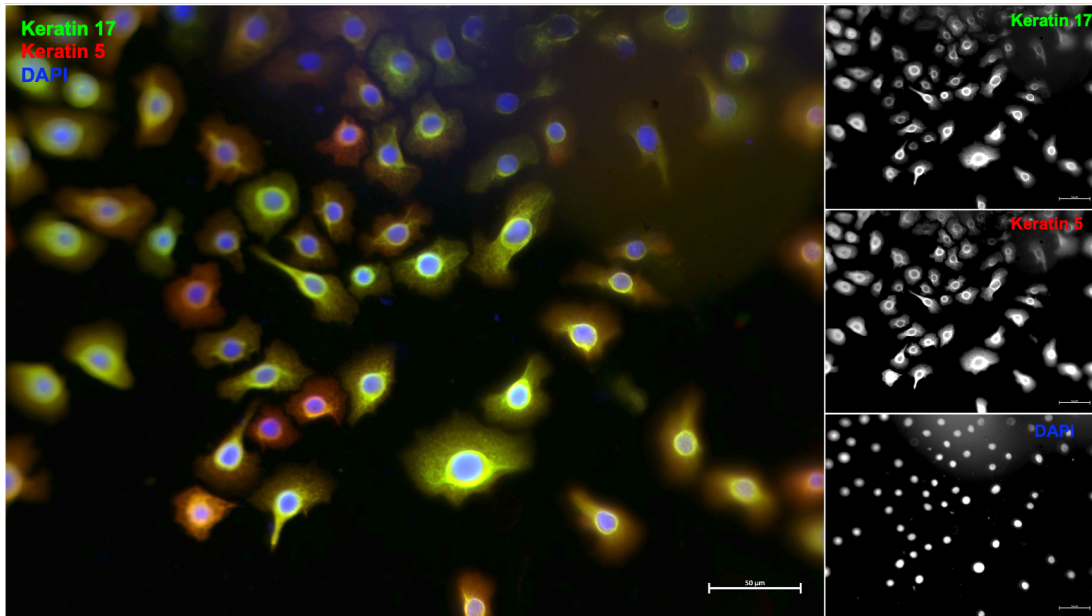


Abbildung 37: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 17 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)
Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

In **Abbildung 38** lassen sich einzelne, bereits ausgewachsene Keratinozyten direkt am HF erkennen. Diese Zellen zeigen ein positives Signal für Keratin 14 (rot), Keratin 1 (grün) hingegen konnte in den Keratinozyten in dieser Färbung nicht nachgewiesen werden.

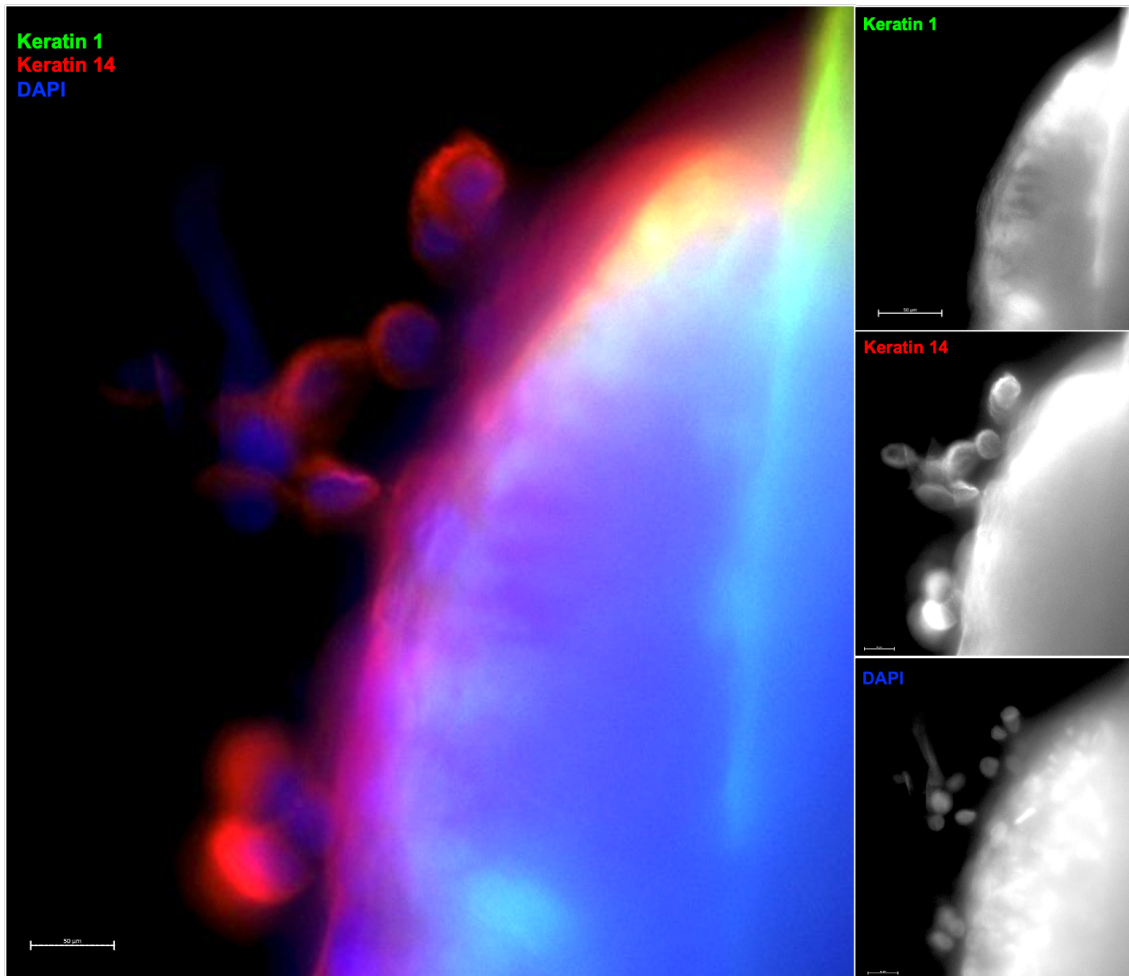


Abbildung 38: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 1 (grün), Keratin 14 (rot) und DAPI (blau)
Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

Bei der Färbung der Keratine 16 (grün) und Keratin 5 (rot) zeigte sich, dass eine Expression von Keratin 16 in den Keratinozyten nicht nachweisbar war (siehe **Abbildung 39**). Die Expression von Keratin 5 hingegen zeigte sich wieder, wie in anderen Fotografien bereits verdeutlicht, deutlich in all den ausgewachsenen Keratinozyten exprimiert.

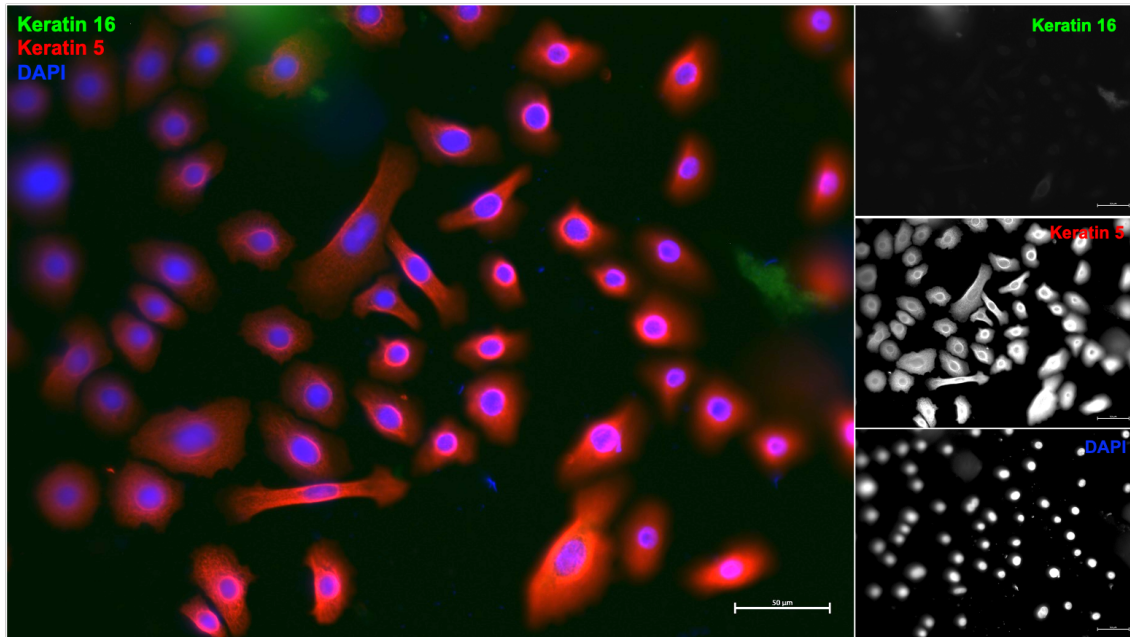


Abbildung 39: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 16 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)
Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

Bei Färbung des Keratin 19 (grün) wurde festgestellt, dass die ersten auswachsenden Keratinozyten hinsichtlich der Expression von Keratin 19 kein positives Signal zeigten. Die vorgenommene Gegenfärbung mit Keratin 5 (rot) hingegen zeigte wieder ein positives Expressionsmuster (siehe **Abbildung 40**).

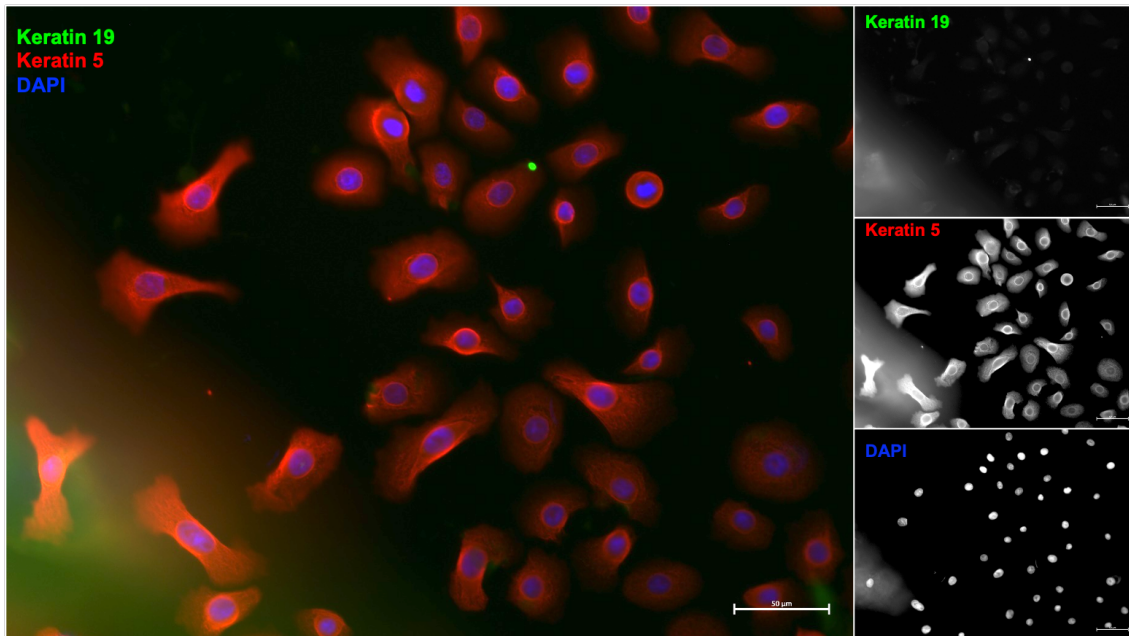


Abbildung 40: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 19 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)
Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

Beim Mikroskopieren konnten keine Keratinozyten erfasst werden, die Keratin 25 (grün) exprimieren und somit ein positives Signal dahingehend aussenden. Erneut zeigte sich die Färbung mit Keratin 5 (rot) jedoch positiv (siehe **Abbildung 41**).

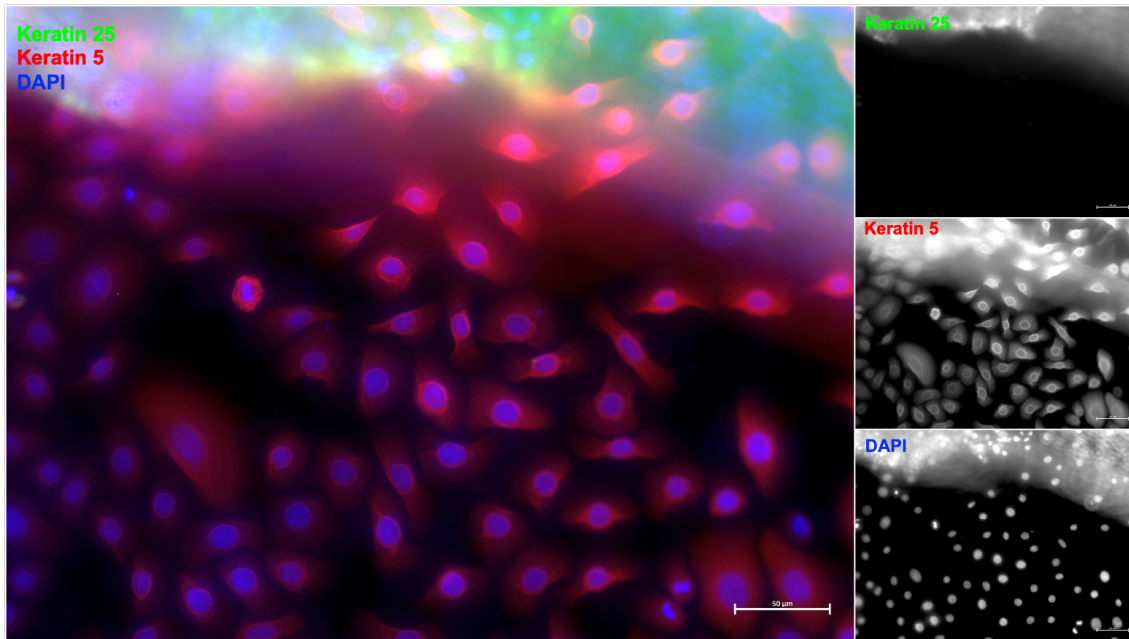


Abbildung 41: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 25 (grün), Keratin 5 (rot) und DAPI (blau)
Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in 20-facher Vergrößerung, Maßstab 50µm

Bei der Färbung von Keratin 5 (grün) mit Keratin 10 (rot) gelang es, einen Zustand zu fotografieren, bei dem die Keratinozyten nach dem Fixierungs- und Färbeprozess noch direkt im Verbund zu ihrem HF zu finden waren (siehe **Abbildung 42 a**). Die Keratinozyten zeigten hinsichtlich ihrer Morphologie eine beinahe „blattartige“ Struktur und waren in ihrem Zellverbund in situ (siehe **Abbildung 42 b**). Wie bereits in anderen Färbungen nachgewiesen (siehe z.B. **Abbildung 41**), waren die Zellen positiv für Keratin 5, jedoch konnte keine Expression von Keratin 10 detektiert werden (siehe **Abbildung 42**). Unten angeführt sind die mikroskopischen Aufnahmen dieses Zustandes, sowohl in 10-facher Vergrößerung (siehe **Abbildung 42 a**) als Übersicht, als auch in 20-facher Vergrößerung zur genaueren Verdeutlichung (siehe **Abbildung 42b**). Die gelb gepunktete Linie umrahmt den Bereich in der 10-fachen Vergrößerung der oberen Aufnahmeserie und entspricht dem mit 20-facher Vergrößerung aufgenommenen Bereich.

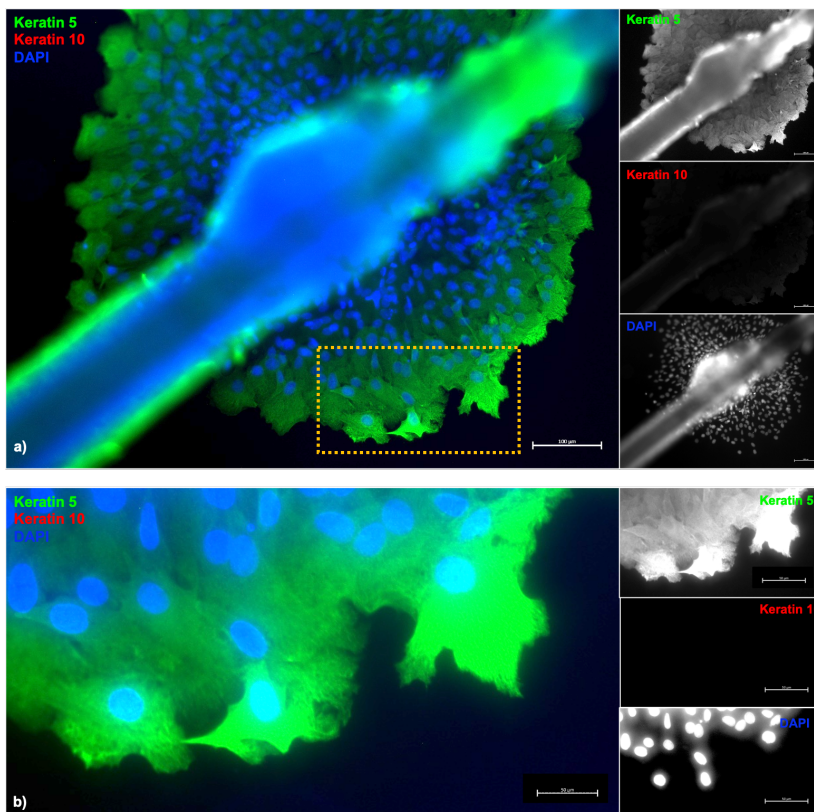


Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbung der ausgewachsenen Keratinozyten mit Keratin 5 (grün), Keratin 10 (rot) und DAPI (blau) in a) 10- und b) 20-facher Vergrößerung
 Gelber gepunkteter Kasten zeigt den Bereich, der in der 20-fachen Vergrößerung dargestellt ist. Aufgenommen mit PrimoVert, Axio Imager M2 in a) 10-facher Vergrößerung (Maßstab 100µm) und b) 20-facher Vergrößerung (50µm)

In **Tabelle 22** sind die Expressionsmuster der Keratine erneut zur Übersicht aufgeführt.

Tabelle 22: Auflistung der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Keratine (sortiert nach absteigendem Molekulargewicht in kDa) und deren Expressierung in den ersten auswachsenden Keratinozyten an den in den DDG inkubierten Haarfollikeln (HF) mit Keratinozyten

<i>Protein</i>	<i>Expressierung in den Keratinozyten</i>
K1	Nicht exprimiert
K6/75	Expressiert
K10	Nicht exprimiert
K5	Expressiert
K6	Expressiert
K14	Expressiert
K15	Expressiert
K25	Nicht exprimiert
K16	Nicht exprimiert
K17	Expressiert
K19	Nicht exprimiert

3.9.2 Genexpressionsanalyse der Keratinozyten

Mit Hilfe der StepOnePlus™ Real-Time PCR wurde von den Spendern S3 und S4 die Genexpression von Keratin 5, Keratin 10, Keratin 14 und Keratin 19 in den Keratinozyten gemessen. Die Werte wurden auf das interne Referenzgen *GAPDH* normalisiert.

Die relative Expression der Keratine in den ausgewachsenen Keratinozyten von Spender 3 wurde in **Abbildung 43** dargestellt.

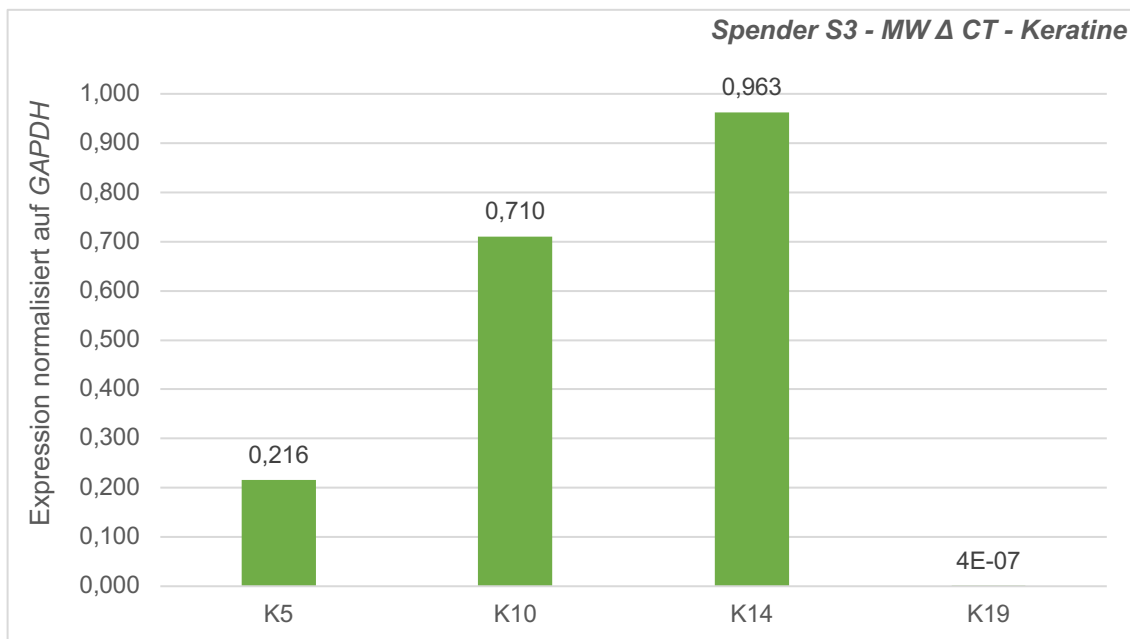


Abbildung 43: Relative Genexpression der Keratine (K 5, 10, 14 u. 19) in den Keratinozyten von Spender S3 normalisiert auf GAPDH – relative Quantifizierung (n=1)
Internes Housekeeping-Gen GAPDH; Zahlen auf drei Nachkommastellen gerundet

Erkennbar ist, dass Keratin 14 den höchsten Expressionswert unter den getesteten Keratinen aufweist, Keratin 19 den geringsten Wert. Keratin 5 weist ebenfalls einen eher geringeren Wert auf.

Keratin 10 konnte in den IF-Färbungen in den Keratinozyten nicht nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 42**), jedoch zeigt sich in der Expressionsanalyse eine durchaus deutliche Expression von Keratin 10.

Für Spender S4 konnte folgendes Diagramm (siehe **Abbildung 44**) erstellt werden (n=1):

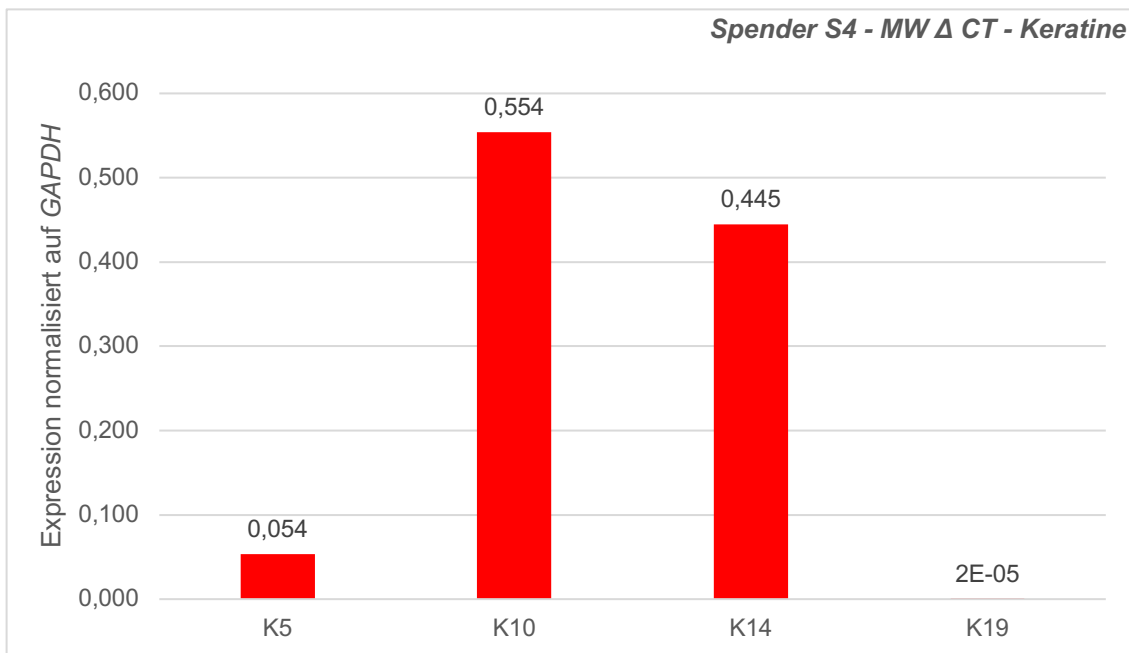


Abbildung 44: Relative Genexpression der Keratine (K 5, 10, 14 u. 19) in den Keratinozyten von Spender S4 normalisiert auf GAPDH – relative Quantifizierung (n=1)
Internes Housekeeping-Gen GAPDH; Zahlen auf drei Nachkommastellen gerundet

Im Vergleich zum weiblichen Spender S3 zeigten die gemessenen Keratine vom männlichen Spender S4 eine geringere Expression.

Die Daten zeigen, dass Keratin 10 die höchste Expression in den Keratinozyten aufweist, gefolgt von Keratin 14 und Keratin 5. Keratin 19 ist auch hier unter den analysierten Keratinen am geringsten (beinahe garnicht) exprimiert.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von Haarfollikeln und ausgewachsenen Keratinozyten

4.1.1 Morphologie der verschiedenen Haarfollikel und deren Veränderung während der Inkubation

Bei der Inkubation der HF mit dem Standardprotokoll (Ausplattierung auf die Matrigel-Beschichtung, Inkubation mit dem HF-Medium, beim Auswachsen von Keratinozyten Wechsel auf das Keratinozyten-Medium, siehe **2.2.3**) konnten, wie im Ergebnisteil unter **3.1** und **3.4** beschrieben, zwei Besonderheiten beobachtet werden:

1. Die Morphologie der gezupften HF variierte stark bei den untersuchten HF:
 - Man konnte sowohl telogene als auch anagene HF unterscheiden (siehe **Abbildung 14**).
 - Die anagenen HF unterschieden sich ebenfalls untereinander (siehe **Abbildung 15**):
 - ➔ Der Abstand zwischen der dermalen Papille bis zum Beginn der äußeren Wurzelscheide kann stark variieren.
 - ➔ Es können Abknickungen im Bereich der Papille und des HF selbst beobachtet werden.
 - ➔ Die innere und äußere Wurzelscheide des HFs kann unvollständig ausgeprägt sein.
2. Die inkubierten HF veränderten ihre Morphologie während des Inkubationsvorgangs
 - Die Dicke der äußeren Wurzelscheide nimmt bei der Inkubation unter den Standardbedingungen stetig zu (siehe **Abbildung 20** und **Abbildung 21**).

In den meisten bisher veröffentlichten Publikationen wird hinsichtlich der verschiedenartigen Morphologie meist nur auf die Unterschiede zwischen anagenen und telogenen bzw. katagenen HF eingegangen. Es wird dabei hauptsächlich auf mikroskopische Unterschiede zwischen diesen Stadien eingegangen und wie sie zu differenzieren sind (Klingenstein et al., 2020, Wustner et al., 2022, Aasen and Izpisua Belmonte, 2010, Raab et al., 2014).

Im Rahmen dieser Dissertation wird nicht nur auf die mikroskopisch sichtbaren Unterschiede zwischen den HF eingegangen, sondern auch die verschiedenartige Morphologie der HF innerhalb der anagenen Wachstumsphase gezeigt.

HF der anagenen Phase, welche für die Ausplattierung und Kultivierung gewünscht sind, besitzen eine schon mit dem bloßen Auge sichtbare weiße Wurzelscheide (Klingenstein et al., 2020). Auch bei der mikroskopischen Untersuchung kann bei den anagenen HF sowohl der zentral gelegene Haarschaft als auch eine innere und äußere Wurzelscheide differenziert werden (Schneider et al., 2009). Diese Kriterien für die Identifizierung der guten anagenen HF konnten auch in dieser Dissertation angewandt und bestätigt werden.

Auch hinsichtlich der morphologischen Veränderung der HF während des Inkubationsvorgangs ist in verschiedenen Publikationen (Wustner et al., 2022, Klingenstein et al., 2020) sogar eine Veränderung in der Dicke und Form der äußeren Wurzelscheide während des Inkubationsvorgangs beim Auswachsen und bei der Kultivierung der Keratinozyten in den gezeigten Bildern sichtbar, jedoch wurde diese Veränderung nicht näher beschrieben oder gar quantifiziert. Diese und weitere Parameter wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. In **Abbildung 21** ist erkennbar, dass die Dicke während der Inkubation mit dem HF-Medium und später dem Keratinozyten-Medium bei allen vier Spendern in den durchgeführten Versuchen stetig zunimmt. Die genauen Zahlen der Dickenzunahme sind in **Tabelle 26** und **Tabelle 27** im Anhang aufgeführt.

Gründe für die morphologische Veränderung der HF bei der Inkubation mit dem HF-Medium und dem Keratinozyten-Medium könnten primär Differenzierungsvorgänge im HF mit anschließender Proliferation der HF-Zellen sein.

Das für die Herstellung des HF-Medium verwendete DMEM (siehe **Tabelle 17**)

hat laut Herstellerangaben eine Calcium-Chlorid-Konzentration (=CaCl₂) von 1,8018018 mM. Dies ist wichtig zu wissen, da Keratinozyten sehr Calcium-sensibel sind und ihre Proliferation und Differenzierung weitgehend durch Calcium reguliert wird (Bikle et al., 2012). Durch Zugabe dieses Mediums werden die Differenzierungsprozesse im HF angeregt, wodurch vermutlich eine erste morphologische Veränderung der HF stattfindet. Die Zellen der äußeren und auch inneren Wurzelscheide gehen bei ihrer Differenzierung von einem weniger in einen stärker spezialisierten Zustand über, um das Auswachsen der Keratinozyten zu provozieren.

Sobald die ersten Keratinozyten auswachsen, erfolgt die Änderung des Inkubationsmediums auf das Keratinozyten-Medium, da eine weitere gewünschte Proliferation der Keratinozyten nur bei geringen Calcium-Konzentrationen erfolgen kann (Bikle et al., 2012).

Das Epilife®-Medium, welches den Hauptbestandteil des Keratinozyten-Mediums ausmacht, hat eine CaCl₂-Konzentration von 0,06 mM (= 60 µM) und damit eine deutlich geringe Calciumkonzentration als das HF-Medium, welches zu Beginn der Kultivierung als Grundmedium verwendet wurde.

Die nun mögliche weitere Proliferation, also das Wachstum und die Vermehrung von Zellen und Gewebe könnte ein weiterer Grund für die morphologische Dickenzunahme der HF sein.

Bei der durchgeführten Negativkontrolle für diese Versuchsreihe, bei denen die HF nur mit dem Ampuwa®-Medium inkubiert wurden, konnte beobachtet werden, dass nach 48 h die HF dunkler wurden. Eine genaue Differenzierung und Unterscheidung des Haarschafts, der inneren und der äußeren Wurzelscheide war zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch kaum mehr möglich (siehe **Abbildung 22**). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass nach 48 h, spätestens aber nach 72 h der Absterbeprozess der HF beginnt. Grund hierfür könnte sein, dass den HF bei der Inkubation mit Ampuwa® die Nährstoffe fehlten, welche im HF- und Keratinozyten-Medium vorhanden sind, um die Homöostase aufrecht zu erhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- HF der anagenen Wachstumsphase unterscheiden sich untereinander stark hinsichtlich ihrer Morphologie, ein Einfluss auf das Auswachsen von Keratinozyten bei unterschiedlichen Morphologien konnte in dieser Dissertation nicht festgestellt werden, sollte aber Gegenstand weiterer Forschung sein, um den Prozess der Gewinnung von iPSZ weiter zu vereinfachen.
- Morphologische Veränderungen der HF (Dickenzunahme der HF) während der Inkubation unter den Standardbedingungen konnten bereits nach 24 h beobachtet werden.
- Keine Veränderung hinsichtlich einer Dickenzunahme der HF konnte bei den Negativkontrollversuchen festgestellt werden, eher im Gegenteil konnte eine Verdunkelung und Verschmälerung der HF festgestellt werden, welche vermutlich mit dem Absterbeprozess der HF korreliert.

4.1.2 Morphologie der auswachsenden Keratinozyten

Ausgewachsen aus adhärent ausplattierten HF unter Verwendung des Standardprotokolls wurden nach 192 h die ausgewachsenen Keratinozyten unter dem Lichtmikroskop aufgenommen und analysiert. Bei der Untersuchung konnten verschiedenste Morphologien der Keratinozyten beobachtet werden, die auf den Aktivitätszustand der Zellen hindeuten (siehe **Abbildung 18**):

- spindelförmige Keratinozyten mit zentral gelegenen, ovalem Zellkern
- quadratische Keratinozyten mit rund-ovalem Zellkern und mehreren Zytoplasma-Ausläufern
- Keratinozyten in der Mitosephase
- säulenförmige Keratinozyten mit Zytoplasmaausläufern an den gegenüberliegenden Polen der Zelle
- großer kubischer, polygonaler, vermutlich ausdifferenzierter Keratinozyt
- tote, abgeschwommene, kreisrunde Keratinozyten

Es wurden bei der Inkubation unter dem Standardprotokoll hauptsächlich zahlreiche längliche bis quadratische Keratinozyten mit zwei bis mehreren Zytoplasma-Ausläufern, die den aktiven Typ eines Keratinozyten repräsentieren (Wustner et al., 2022), von uns dokumentiert. Zusätzlich zu diesen aktiven Keratinozyten wurde in unserem Versuch (siehe **Abbildung 18**) lediglich eine große kubische Zelle mit polygonalem Zytoplasma gefunden, die vermutlich einem ausdifferenzierten Keratinozyten entspricht.

Dieser Typ Zelle (ausdifferenzierter Keratinozyt) wurde in vorhergehenden Versuchen bereits näher beschreiben (Wustner et al., 2022). In der veröffentlichten Publikation wurde geschlussfolgert, dass diese Morphologie durch die Zugabe eines bestimmten Mediums induziert werden konnte und die Zellen dadurch mitotisch inaktiver wurden. So wurde gezeigt, dass bei der Inkubation mit dem Keratinocyte Growth Medium (= KGM2-Medium) viele dieser ausdifferenzierten Keratinozyten detektiert werden konnten, bei der Inkubation mit dem EpiLife®-Medium (was unserem Keratinozyten-Medium) entspricht, keine dieser ausdifferenzierten Keratinozyten beobachtet werden konnte (Wustner et al., 2022).

Zusätzlich wurde in bereits veröffentlichter Literatur gezeigt, dass die Zellen bei der Immunfluoreszenzfärbung sowohl Keratin 14 als auch Keratin 10 positiv sind. Hinsichtlich Keratin 10 konnte durch Koch und Roop festgestellt werden, dass dieses Keratin in postmitotischen keratinisierten Zellen, also ein Zustand von Zellen, die sich nach der Differenzierung nicht mehr weiter teilen, in den supra-basalen Schichten der Epidermis exprimiert ist (Koch and Roop, 2004). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei diesen Zellen eben um ausdifferenzierte Keratinozyten handelt. Diese Zellen lassen sich auch nicht für die weitere Reprogrammierung zu iPSZ verwenden, da sie durch die Einstellung des Zellzyklus‘ kein replikationsfähiges Virus mehr aufnehmen können (Wustner et al., 2022).

In unseren Keratinozyten-Kulturen, die gegen Keratin-Markern gefärbt wurden (**3.9.1**), konnten keine Keratin 10-positiven Zellen detektiert werden (siehe **Abbildung 42**), was dafürspricht, dass sich zu dem analysierten Zeitpunkt noch keine mitotisch inaktiven Keratinozyten in der Kultur befanden.

Dafürsprechen würde auch, dass die von uns immunhistochemisch gefärbten Keratinozyten noch sehr „jung“ waren und demnach noch mitotisch aktiv sind. Das heißt, in unserer Kultur fanden sich sehr viele teilungsaktive Zellen, gut erkennbar an den doppelten Zellkernen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen:

- ➔ Es konnten verschiedenste Keratinozyten examiniert werden:
 - junge, aktive und mitosefähige Keratinozyten
 - tote, abgeschwommene Keratinozyten
 - ein ausdifferenzierter, postmitotischer Keratinozyt.
- ➔ Bei der Inkubation mit dem HF-Medium und dem Keratinozyten-Medium konnte auch nach acht Tagen Inkubation lediglich ein ausdifferenzierter Keratinozyt examiniert werden, es sind also zahlreiche junge, mitotisch aktive Keratinozyten vorhanden, die für die Reprogrammierung zu iPSZ verwendet werden könnten.

4.1.3 Auswachsen von Zellen im Bereich der dermalen Papille

Im Rahmen der Arbeit wurden insgesamt 330 HF analysiert, bei denen zu 93,4% Keratinozyten aus der äußeren Wurzelscheide der HF ausgewachsen sind. Zwar variierte der Ort an der äußeren Wurzelscheide etwas, was unter **4.1.5** noch näher diskutiert wird. Bei der äußeren Wurzelscheide handelt es sich jedoch vermutlich um den Ort, aus dem die ersten Keratinozyten auswachsen, was unsere Färbungen nahelegen (siehe **4.2**).

Bei zwei HF (6,6 %) der gezupften HF zeigt sich jedoch eine komplett andere Morphologie.

Wie in **Abbildung 17** ersichtlich, konnten bei der Inkubation der HF auch zwei HF untersucht werden, bei denen im Bereich der dermalen Papille das Auswachsen von Zellen beobachtet werden konnte. Diese beiden HF wiesen keine innere und äußere Wurzelscheide auf, die dermale Papille war von einer bindegewebigen Schicht umgeben. Um welche Zellen es sich hierbei genau handelt, kann allein anhand der mikroskopischen Untersuchung nicht festgestellt werden.

Es besteht die Vermutung, dass es sich bei den Zellen um Fibroblasten handeln könnte, welche aus der bindegewebigen Schicht, die die dermale Papille umgibt, ausgewachsen sind. Diese Vermutung könnte man mit einer Färbung gegen den Fibroblasten-Marker Vimentin oder Desmin überprüfen (Ridge et al., 2022).

Eine andere Vermutung ist, dass es sich um dermale Papillarzellen handelt, welche von der dermalen Papille der HF auswachsen und deren Kultivierung bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben wurde (Yamauchi and Kurosaka, 2009, Zhang et al., 2014). Um dies zu bestätigen, müsste eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das LEPTIN-Protein oder gegen Scavenger Receptor Class A Member 5 (SCARA5) durchgeführt werden, da diese Proteine aus dermalen Papillarzellen bei der „flow cytometry“ gefunden werden konnten (Gao et al., 2022).

Es gibt publizierte mikroskopische Fotografien von kultivierten humanen HF-Papillen, an denen das Auswachsen von dermalen Papillarzellen gezeigt wurde (Zhang et al., 2014, Yamauchi and Kurosaka, 2009). Die Zellen wachsen direkt an der dermalen Papille aus, zeigen sich z.T. spindelförmig, dreieckig und leicht polygonal mit mehreren Ausläufern und sind morphologisch identisch mit den auswachsenden Zellen im Bereich der dermalen Papille aus **Abbildung 17**. Abschließend lässt sich sagen, dass aufgrund der Nähe zur dermalen Papille und der morphologischen Ähnlichkeit der auswachsenden Zellen an den von uns inkubierten HF die Vermutung aufgestellt werden kann, dass es sich bei den Zellen aus **Abbildung 17** um dermale Papillarzellen handeln könnte, dies jedoch nur durch eine genauere immunologische Untersuchung mit den Markern LEPTIN oder SCARA5 der Zellen abschließend hätte geklärt werden können (Gao et al., 2022).

Folglich lässt sich daraus schließen, dass die Zellen, die im Bereich der dermalen Papille auswachsen sind ...

- ➔ ... sowohl Fibroblasten sein könnten als auch dermale Papillarzellen.
- ➔ ... nur über die IF-Färbungen mit den jeweiligen Markern (LEPTIN oder SCARA5 für dermale Papillarzellen bzw. Vimentin oder Desmin für Fibroblasten) genau bestimmt werden können.

4.1.4 Zeitdauer bis zum Auswachsen erster Keratinozyten

Nachdem zuvor auf die unterschiedliche Morphologie der ersten auswachsenden Keratinozyten eingegangen wurde, liegt nun die Zeitdauer bis zum Erscheinen dieser ersten Zellen im Fokus. Diese Untersuchungen machten einen Großteil der Forschung innerhalb dieser Dissertation aus. Die Ergebnisse zeigten, dass das Auswachsen der ersten Keratinozyten in einem Zeitrahmen von 24 bis 96 h erfolgte, also zwischen einem und fünf Tagen Inkubation. Bei den 24 unabhängigen Analysen der HF wuchsen bei n= 6 die ersten Keratinozyten nach 24 h Inkubation aus (\cong 25 %), bei n= 9 nach 48 h (\cong 37,5 %), bei n= 8 nach 72 h Inkubation (\cong 33,33 %) und bei n= 1 nach 96 h Inkubation (\cong 4,17 %).

In früheren Publikationen konnte bei der Inkubation von HF das Auswachsen der ersten Keratinozyten im Bereich der äußeren Wurzelscheide nach fünf Tagen festgestellt werden (Aasen et al., 2008). In einer weiteren Publikation zur Kultivierung von Keratinozyten aus gezupften humanen HF zur späteren Generierung von iPSZ wurde das Auswachsen der ersten typischen epithelialen Keratinozyten nach durchschnittlich drei bis vier Tagen, also nach 72 bis 96 h beschrieben (Aasen and Izpisua Belmonte, 2010). In weiteren Publikationen variierte das Auswachsen der ersten Keratinozyten in einem Zeitraum von 24 bis 48 h (Klingenstein et al., 2020) teilweise sogar bis 168 h nach der Inkubation (Klingenstein et al., 2020, Raab et al., 2014, Wustner et al., 2022).

Bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen lagen die Median-Werte der Spender S1, S2 und S4 bei 48 h, der von S3 bei 72 h, was auf ein schnelles Auswachsen der ersten Keratinozyten hindeutet, im Vergleich zu den z.T. oben aufgeführten Zeitspannen. Hierbei sollte nochmals betont werden, dass bei einem Viertel der durchgeführten Versuche das Auswachsen schon nach 24 h beobachtet werden konnte.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass kein genauer Zeitpunkt definiert werden kann, bei dem die ersten Keratinozyten an den inkubierten HF auswachsen und dass die Zeitpunkte stark von den Spendern und den Kultivierungsbedingungen abhängen. Die Auswachsgeschwindigkeit der HF der vier gemessenen Spender

lag somit unter den in den anderen Publikationen erwähnten Zeiträumen (vgl. 72 bis 96 h oder bis zu 168 h).

Bei den von Klingenstein und Kollegen durchgeführten Versuchen zeigte sich das erste Auswachsen z.T. auch bereits nach 24 bis 48 h und war damit am ehesten vergleichbar mit den hier gemessene Zeitpunkten, was sich durch die sehr ähnlichen Kulturbedingungen mit HF-Medium und Keratinozyten-Medium erklären lässt (Klingenstein et al., 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ...

- ➔ ... in der Literatur der Zeitpunkt des ersten Auswachsens der Keratinozyten sehr stark variiert (24-168 h).
- ➔ ... die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Median-Werte mit 48-72 h z.T. unter den Werten anderer veröffentlichter Zeitpunkte liegen oder diesen sehr ähnlich sind.

4.1.5 Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten

Bisher gibt es keine Daten, die zeigen, an welchem Bereich der inkubierten HF die ersten Keratinozyten auswachsen. Die genauere Beschreibung und Analyse des Ortes an den verschiedenen HF (insgesamt n= 36 HF von vier verschiedenen Spendern) erfolgte daher erstmals durch die Forschung im Rahmen dieser Dissertation.

Es konnte beobachtet werden, dass in den meisten Fällen das Auswachsen der ersten Keratinozyten im Bereich des Beginns der äußeren Wurzelscheide erfolgte, jedoch auch bei einigen HF im hinteren Bereich der äußeren Wurzelscheide.

In der bisher veröffentlichten Literatur wird oft nur verallgemeinert beschrieben, in welchem Bereich des HF die ersten Keratinozyten auswachsen, eine genauere Spezifizierung erfolgte nicht.

In der erstbeschreibenden Publikation wird gezeigt, dass die Keratinozyten von der äußeren Wurzelscheide auswachsen, jedoch konnte kein Auswachsen im

Bereich der Ausbuchtung des HF beobachtet werden (Aasen et al., 2008).

In anderen Publikationen wird meist in einem Bild gezeigt, in welchem Bereich die ersten Keratinozyten auswachsen (vorderster Bereich der äußeren Wurzelscheide, vgl. **Abbildung 28**), jedoch wird der Ort des ersten Auswachsens im Verlauf nicht näher beschrieben (Wustner et al., 2022, Klingenstein et al., 2020).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde, wie unter **3.6** des Ergebnisteils gezeigt, der HF in drei Abschnitte unterteilt, in denen das Auswachsen der ersten Keratinozyten beobachtet werden kann. Bei über 80 % der untersuchten Follikel wuchsen die ersten Keratinozyten im Bereich des 2. Teils des Device aus (siehe **Abbildung 28**). Jedoch konnte auch ein HF examiniert werden, bei dem die Keratinozyten im 1. Teil des Device auswuchsen (siehe **Abbildung 45**) und sechs HF, an denen die Keratinozyten im 3. Teil des Device auswuchsen (siehe z.B. **Abbildung 29** und **Abbildung 46**).

Bei dem einen HF von Spender S3, bei dem das Auswachsen der Keratinozyten im 1. Teil des Device beobachtet werden konnte (siehe **Abbildung 45**), zeigte sich die Länge des Haarschaftes zwischen der dermalen Papille und dem Beginn der äußeren und inneren Wurzelscheide mit 590 μm recht kurz (siehe rote Linie, Länge ca. 590 μm , **Abbildung 45**), was eine Erklärung dafür sein könnte, dass sich die Keratinozyten nun einmal in den Bereich des 1. Teils des Device projizierten.

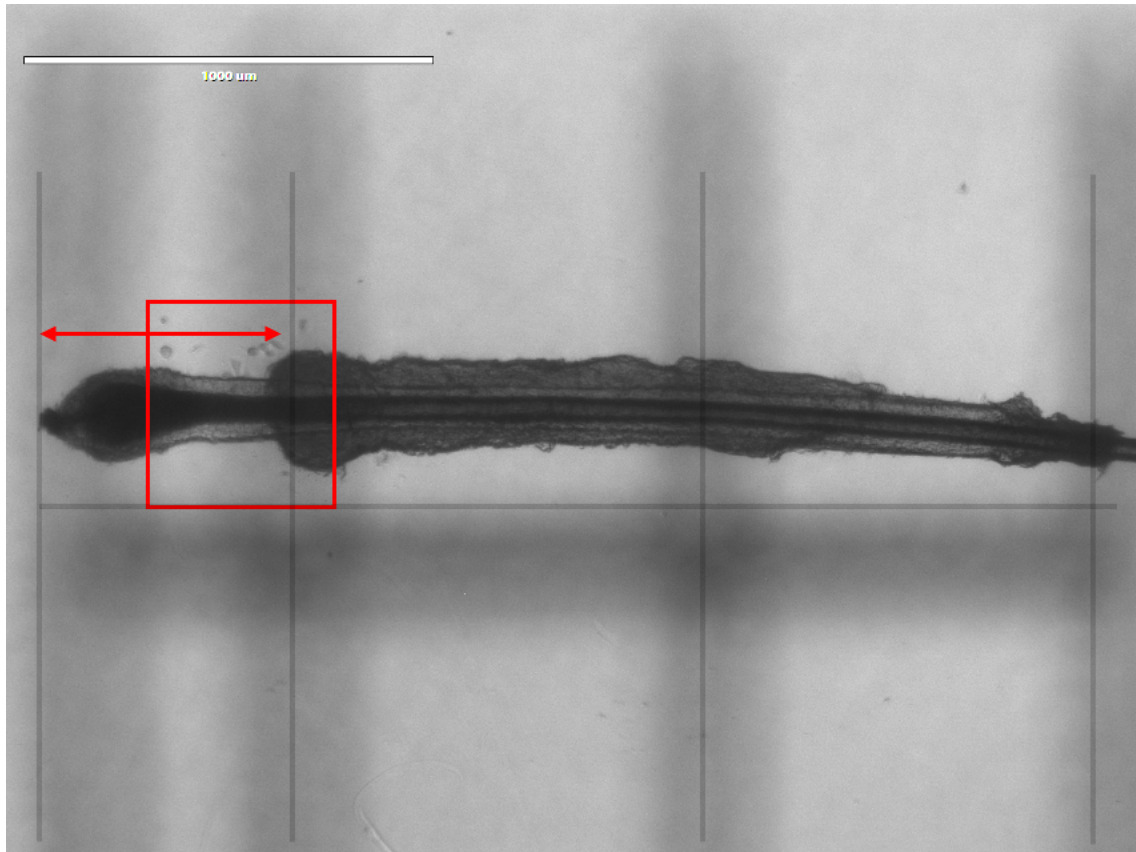


Abbildung 45: Haarfollikel des Spenders S3 nach 48h Inkubation unter Standard-Bedingungen; Keratinozyten-Wachstum im Bereich des 1.Teils des Device
Rotes Rechteck zeigt den Bereich des Keratinozyten-Wachstums; Roter Pfeil verdeutlicht die kurze Strecke (ca. 590 µm) vom Beginn der dermalen Papille bis zum Anfang der äußeren Wurzelscheide.
Device in grau eingefügt zur Verdeutlichung der Linien.
Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000µm mit Device

Andere HF wiederum wiesen einen sehr langen Haarschaft von der Spitze der dermalen Papille bis zum Beginn der äußeren Wurzelscheide auf, nämlich ca. 1230 μm (siehe **Abbildung 46** mit rotem Pfeil zur Verdeutlichung der langen Strecke).



Abbildung 46: Haarfollikel des Spenders S1 nach 72h Inkubation unter Standard-Bedingungen; Keratinozyten-Wachstum im Bereich des 3.Teils des Device

Rotes Rechteck zeigt den Bereich des Keratinozyten-Wachstums; Roter Pfeil verdeutlicht die lange Strecke (ca. 1.230 μm) vom Beginn der dermalen Papille bis zum Anfang der äußeren Wurzelscheide.

Device in grau eingefügt zur Verdeutlichung der Linien.

Aufgenommen mit dem Evos™ Mikroskop in 4-facher Vergrößerung, Maßstab 1000 μm mit Device

Im Vergleich zu der Strecke von ca. 730 μm bei dem HF aus **Abbildung 28**, bei welchem die Keratinozyten im 2. Teil des Device auswachsen, haben wir in **Abbildung 45** eine Verkürzung der Strecke um ca. 140 μm und in **Abbildung 46** eine Verlängerung der Strecke um beinahe 500 μm .

Ob die Länge der Strecke des Haarschafts von der Spitze der dermalen Papille bis zum Beginn der äußeren Wurzelscheide und somit die unterschiedliche Morphologie der anagenen HF eine Rolle dabei spielt oder einen Einfluss darauf hat, in welchem Bereich die ersten Keratinozyten entlang des HF auswachsen, konnte in dieser Dissertation bei einer Zahl von $n=36$ untersuchten HF nicht abschließend geklärt werden und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Zusammenfassend wurde bei den Untersuchungen hinsichtlich des Auswachsortes der ersten Keratinozyten festgestellt:

- ➔ Es gibt keine Quellen oder Publikationen, in denen der Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten untersucht oder gar erwähnt wurde.
- ➔ In über 83 % der von uns untersuchten HF wuchsen die ersten Keratinozyten am Ansatzpunkt der äußeren Wurzelscheide am Haarschaft aus (1. und 2. Teil des Device).
- ➔ Bei ca. 17 % der von uns untersuchten HF wuchsen die ersten Keratinozyten im 3. Teil des Device aus, was einem Auswachsen entlang der äußeren Wurzelscheide in der hinteren Hälfte des HF entspricht.
- ➔ Ob die unterschiedliche Morphologie der HF vor allem hinsichtlich der Haarschaftlänge zwischen dermalen Papille und Beginn der äußeren Wurzelscheide einen Einfluss auf den Ort des Auswachsens hat, kann vermutet werden, muss aber durch weitere Versuche bestätigt werden.

4.1.6 Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den gezupften HF

Im Rahmen dieser Dissertation konnte festgestellt werden, dass die durchschnittliche Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Standardbedingungen bei 48 h bis 72 h lag, und insgesamt unter allen gemessenen HF zwischen einem und fünf Tagen variiert hat. Im Folgeschritt wurde erforscht, ob durch die Zugabe verschiedener Zellkulturzusätze das Auswachsen zu einem noch schnelleren Zeitpunkt erreicht werden konnte. Eine Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen könnte gerade bei den HF vor Vorteil sein, die generell länger bis zum Auswachsen brauchen, da somit die mechanische Belastung der inkubierten HF durch das tägliche Wechseln des Kulturmediums reduziert werden könnte. Dies könnte ein Abschwimmen des HF von dem Kulturboden vorbeugen und somit auch die generelle Wahrscheinlichkeit zum Auswachsen der Keratinozyten erhöhen.

Im Rahmen der Forschungsarbeit konnte bei den gemessenen HF (n= 123), die mit dem HF-Medium plus Zellkulturzusätzen inkubiert wurden, eine Erfolgsquote von 58,54 % (also an 72 der insgesamt 123 HF sind Keratinozyten ausgewachsen) erreicht werden. Bei der Kultivierung der HF unter dem Standardprotokoll, also bei der Verwendung des HF-Mediums wurden n= 162 HF untersucht, die Erfolgsquote lag hier bei ca. 47,5%.

In **Tabelle 23** sind die verwendeten Zellkulturzusätze und die Erfolgsquote hinsichtlich des Auswachsens der ersten Keratinozyten aufgeführt. Zu beachten für die Berechnung der Erfolgsquote ist hierbei, dass pro Zellkulturzusatz und im Kontrollversuch je 24 HF (\cong 100 %) inkubiert wurden.

Tabelle 23: Durchgeführte Versuche (verschiedene Medien und Zellkulturzusätze) und die Erfolgsquote hinsichtlich des Auswachsens der Keratinozyten. Bei den Zellkulturzusätzen und dem Kontrollversuch wurden je 24 HF untersucht, bei den Standardbedingungen wurden 162 HF untersucht.

Grundmedium	Zellkulturzusatz mit Endkonzentration	Anmerkung	Erfolgsquote in %
1,5ml MEF	-	Kontrollversuch	41,67 %
1,5ml MEF + FGF2 (20 ng/ml) + Y27632 (10 µM)	-	Standardbedingungen	47,5 %
	20 ng/ml IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I	50 %
	10 µm SB431542	TGF-β receptor kinase Inhibitor	50 %
	20 ng/ml EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	58,3 %
	10 µm A83-01	TGF-β Type-I Inhibitor	62,5 %
	10 µm DAPT	Notch-Inhibitor (= γ-Sekretase Inhibitor)	79,2 %

4.1.6.1 HF-Medium ohne Zusätze – Kontrollversuch

Als Kontrolle wurden 24 HF mit dem MEF-Grundmedium ohne weitere Zusätze analysiert. Bei dieser Versuchsreihe sollte das Wachstumsverhalten der HF und Keratinozyten ohne jeglichen Einfluss von Zusätzen untersucht werden und als Vergleich für die Analyse der jeweiligen zugegebenen Moleküle dienen (beim HF-Medium Zugabe von: 20 ng/ml FGF2 und 10 µm Y27632). Bei der Inkubation mit dem Standard-HF-Medium wurden insgesamt 162 HF kultiviert, hierbei konnte an 47,5 % der inkubierten HF das Auswachsen von Keratinozyten beobachtet werden. Die Erfolgsquote ist somit, wie erwartet, höher als bei den Versuchen ohne die Zugabe der beiden Zusätze (Erfolgsquote bei nur HF-Medium: 41,76 %).

Erstaunlicherweise konnte bei dem Kontrollversuch unter diesen Bedingungen ohne jegliche Wachstumsfaktoren dennoch das Auswachsen von Keratinozyten an zehn der insgesamt 24 inkubierten HF in einem Zeitraum zwischen 48 und 96 h beobachtet werden, was eben dieser Erfolgsquote von 41,67% entspricht. In diesen Fällen waren die Zusätze des Grundmediums (DMEM, FCS, GlutaMax™, Anti-Anti, Nicht-essenzielle Aminosäuren) für die Kultivierung der Keratinozyten ausreichend. Vermutlich spielte hierbei vor allem das FCS die ausschlaggebende Rolle, da bekannt ist, dass die meisten Zellen bei Zugabe von FCS proliferieren und florieren (van der Valk, 2022).

4.1.6.2 IGF-1

Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor 1-Signalweg (siehe **Abbildung 47**) ist ein gut konservierter Signalweg, der in viele Zellvorgänge involviert ist. Für uns besonders interessant ist die Tatsache, dass durch die Bindung von IGF-1 an den IGF-1 Rezeptor in der Zellmembran unter anderem das Shc-Protein autophosphoryliert und somit aktiviert wird. Durch diesen Schritt wird die RAS/MAP Kinase aktiviert, wodurch es abschließend zu einer gesteigerten Zellproliferation kommt (Jung and Suh, 2014).

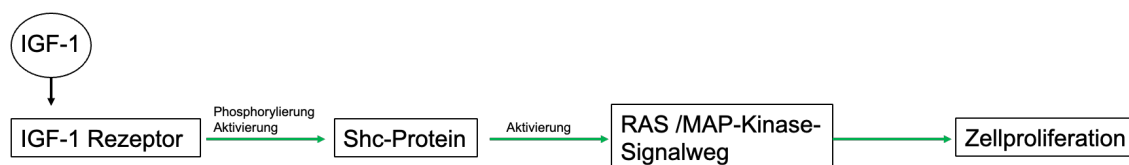


Abbildung 47: Wirkung von IGF-1 über den IGF-1 Rezeptor auf den IGF-1 Signalweg
 Durch die Aktivierung verschiedener Proteine (RAS-Protein = rat sarcoma Protein; MAP = Mitogen-activated protein) kommt es zur Zellproliferation (Jung and Suh, 2014)

Der Insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) wurde von uns als Zellkulturzusatz zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten verwendet, da der oben beschriebene IGF-1-Signalweg eine vielversprechende Option für die Steigerung der Zellproliferation bietet. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass epidermale Keratinozyten einen IGF-1 Rezeptor exprimieren, welcher durch IGF-1 stimuliert wird. Durch diesen Prozess

konnte nachweislich die Proliferation und Mitogenität dieser Zellen aktiviert werden (Sadagurski et al., 2006).

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde überprüft, ob die Zugabe von IGF ebenfalls einen Einfluss auf die Zellteilungsrate und Proliferation unserer HF und den daran auswachsenden Keratinozyten hat.

Bei der Analyse unserer Versuchsdaten zeigte sich bei den Spendern S1 (n= 6) und S4 (n= 6) keine Verbesserung hinsichtlich der Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten. Lediglich bei Spender S2 konnte der Medianwert auf 24 h reduziert werden (n= 6). Auffällig war jedoch, dass bei Spender S3 an keinem der sechs inkubierten HF das Auswachsen von Keratinozyten beobachtet werden konnte.

So zeigte sich die Verwendung von IGF-1 als Zellkulturzusatz im Allgemeinen als nicht wirksam, der bei epidermalen Keratinozyten erzielte Effekt hinsichtlich einer Steigerung der Proliferations- und Zellteilungsrate konnte nicht homogen auf die Kultivierung der Keratinozyten aus humanen HF übertragen werden. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die HF-Zellen im Bereich der äußeren Wurzelscheide den oben erwähnten IGF-Rezeptor im Vergleich zu den „klassischen“ epidermalen Keratinozyten nicht exprimieren und deswegen die Zugabe von IGF diesen Erfolg nicht reproduzieren konnte.

4.1.6.3 Die TGF- β -Inhibitoren

4.1.6.3.1 SB431542

Die Verwendung von SB431542 (TGF- β Rezeptorkinase Inhibitor) wurde in Betracht gezogen, da es ebenso wie A83-01 als TGF- β Inhibitor fungiert (Tojo et al., 2005, Zarrabi et al., 2020). Durch Tojo et al. konnte 2005 gezeigt werden, dass die Zugabe von 3 μ M SB431542 die wachstumshemmenden Effekte von TGF- β hemmen kann. Die Überlegung in dieser Dissertation war nun, dass auch die Zellen der äußeren Wurzelscheide unserer HF durch die Zugabe dieses TGF- β -Rezeptorkinase-Inhibitors einen positiven Einfluss auf die Proliferation erfahren. Verdeutlicht wird die Wirkung von SB431542 innerhalb des TGF- β -Signalwegs in der untenstehenden **Abbildung 48**.

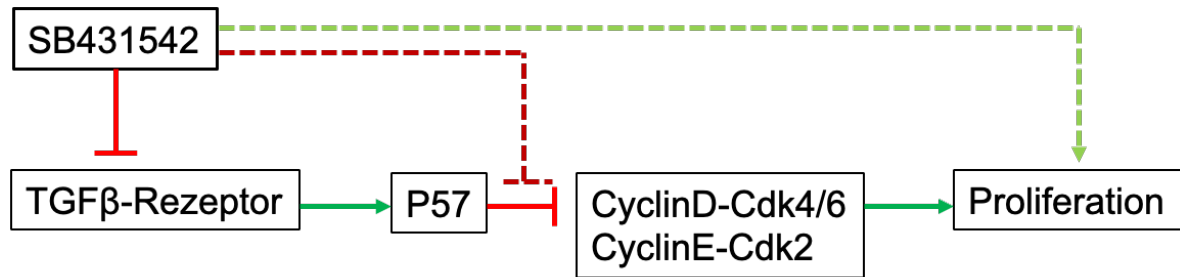


Abbildung 48: Verdeutlichung der Wirkung von SB431542 als TGF- β Rezeptorkinase Inhibitor

SB431542 hemmt den TGF- β -Rezeptor, dadurch kann die Aktivierung des Proteins P57 nicht erfolgen und die eigentliche Hemmung von CyclinD-Cdk4/6 und CyclinE-Cdk2 wird gehemmt, was abschließend zu einer Steigerung der Proliferation führt (Zarrabi et al., 2020)

Tatsächlich hatte SB431542 jedoch keinen positiven Effekt hinsichtlich der Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten. Bei den Spender S1, S2, S4 (jeweils n= 6) blieb der Median-Wert mit jeweils 48 h gleich wie der Median-Wert (48 h) bei den Versuchen mit dem Grundmedium. Bei Spender S3 (n= 6) verschlechterten sich die Inkubationsbedingungen unter SB431542 sogar deutlich. An keinem der sechs inkubierten HF konnte das Auswachsen von Keratinozyten beobachtet werden.

4.1.6.3.2 A83-01

Zur Förderung der Proliferation von Zellen kann neben der Aktivierung / Inhibierung anderer Signalwege, die im Verlauf dieser Dissertation beschrieben wurden oder noch werden, auch der TGF- β -Signalweg inhibiert werden. Der Einfluss auf diesen Signalweg durch die Zugabe des TGF- β -Rezeptorkinase-Inhibitors SB431542 wurde unter 4.1.6.3.1 bereits beschrieben. Nun soll noch die Wirkung des TGF- β Type-I Inhibitors A83-01 auf diesen Signalweg beschrieben werden (siehe **Abbildung 49**).

TGF β bindet an den TGF β -II-Rezeptor, wodurch der TGF β -I-Rezeptor aktiviert wird. Hierdurch erfolgt eine Phosphorylierung und damit einhergehend eine Aktivierung der SMAD2 und SMAD3 Proteine. Diese beiden bilden darauffolgend einen Komplex mit dem SMAD4 Protein, welches die intrazelluläre Genexpression

steuert. Hierdurch kommt es zu einer Inhibierung der Proliferation von epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen (Tojo et al., 2005). Wird nun der TGF β -I-Rezeptor durch die Zugabe von A83-01 inhibiert, kommt es zu einer „Hemmung der Hemmung“ und daraus folgend zu einer Aktivierung der Proliferation von epithelialen Zellen (Tojo et al., 2005). Diesen Effekt wollten wir uns mit der Zugabe von A83-01 als Zellkulturzusatz zunutze machen.

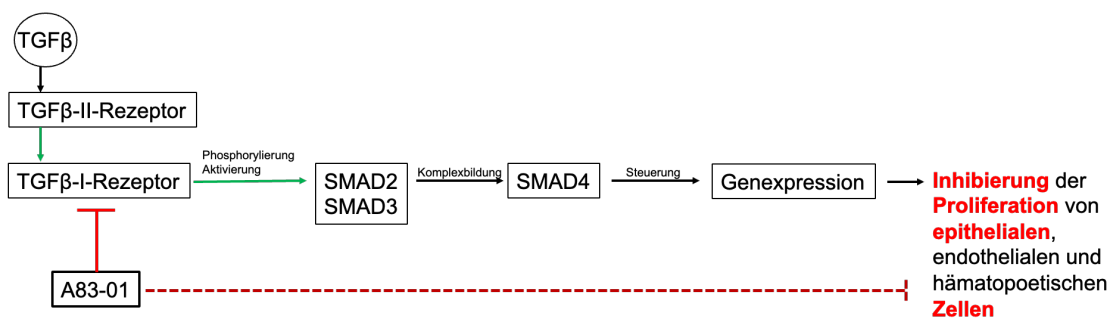


Abbildung 49: Wirkung des TGF β -Rezeptor-Inhibitors A83-01

Durch die Inhibierung des TGF β -I-Rezeptors durch A83-01 kann der normale TGF β -Signalweg nicht ablaufen, die abschließende Inhibierung der epithelialen Zellproliferation wird selbst inhibiert, als Resultat kommt es zu einer Förderung dieser Zellproliferation (Tojo et al., 2005).

Zusätzlich konnte bei Untersuchungen von humanen epithelialen Zellen aus der Haut, des respiratorischen Traktes, den Brust- und Prostatastrüden bei der gleichzeitigen Verwendung von Y27632 und des TGF- β -Inhibitors eine Expansion epithelialer Stamm- und Vorläuferzellen erreicht werden. In diesem Zuge fanden die Forscher auch heraus, dass durch Zugabe dieser Moleküle das Stresslevel der Zellen reduziert wurde, sodass die Proliferation der Zellen vonstattengehen kann (Zhang et al., 2018).

Im Hinblick auf dieses Wissen untersuchten wir, ob die Verwendung von A83-01 auch auf die Kultivierung der Keratinozyten aus den humanen HF angewendet werden kann, um ähnlich positive Ergebnisse zu erzielen.

Bei den von uns durchgeführten Versuchen wurde der TGF- β -Inhibitor ebenfalls in Kombination mit Y27632 (10 μ M) und FGF2 (20 ng/ml) zur Kultivierung verwendet.

Es konnten bei der Verwendung dieses Zellkulturzusatzes zwar bei einem der

vier Spender eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen festgestellt werden (S2, n= 6: Median-Wert 24 h), jedoch bestätigte sich dieser positive Effekt nicht bei den anderen Spendern (S1, n= 6: Median-Wert 48 h; S3, n= 6: Median-Wert 96 h; S4, n= 6: Median-Wert 60 h). Die von Zhang et al. beschriebene Expansion humaner epithelialer Stamm- und Vorläuferzellen (Zhang et al., 2018) blieb bei unseren Versuchen aus; auch der durch die Forschung von Tojo et al. vermutete Effekt der Aktivierung der Proliferation durch die Verwendung von A81-01 (Tojo et al., 2005) konnte nicht bestätigt werden. In unseren Versuchen konnte keine homogene Beschleunigung des Auswachsens festgestellt werden, auch die Anzahl der auswachsenden Keratinozyten schien nicht positiv beeinflusst zu werden.

Abschließend konnte daher keine Verbesserung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten bei der Verwendung von TGF- β -Inhibitoren (weder bei A83-01 als TGF- β Type I-Inhibitor, noch bei SB431542 als TGF- β receptor kinase Inhibitor) beobachtet werden. Eine Vermutung, warum die oben beschriebenen positiven Effekte nicht auf die HF angewendet werden konnten, könnte sein, dass die Signalwege in den Zellen der HF durch das Durchlaufen der drei Wachstumsphasen (Langan et al., 2015) nicht auf die Signalwege in „normalen“ epithelialen Zellen übertragen werden können, da bekannt ist, dass der Übergang zwischen den verschiedenen Wachstumsphasen stark von Veränderungen in der lokalen Umgebung der HF abhängt (Zhang et al., 2021). Sollten diese Bedingungen durch die Zugabe unserer Zellkulturzusätze verändert werden, können die regulären Prozesse nicht ablaufen, die eigentlich vermutete Proliferationssteigerung kann nicht vonstattengehen.

4.1.6.4 EGF

Allgemein ist zu dem EGF-Signalweg (siehe **Abbildung 50**) zu sagen, dass über die Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor eine Aktivierung des RAS-Proteins erfolgt. Hierdurch werden verschiedene andere Target-Proteine phosphoryliert, was schlussendlich zu einer Zellproliferation führt (Lo and Hung, 2006). Diese

Tatsache bestärkte unser Vorhaben, die proliferative Wirkung von EGF auf die Zellen des HF zu übertragen.

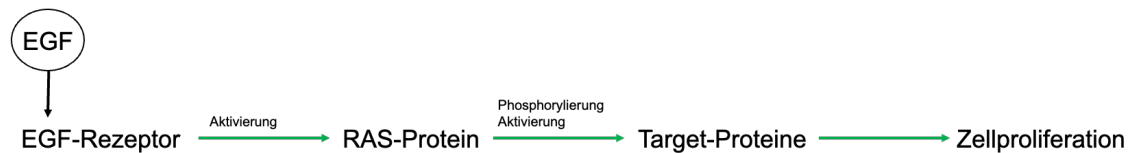


Abbildung 50: Wirkung von EGF über den EGF-Rezeptor auf den EGF-Signalweg
Aktivierung des RAS-Proteins (=rat sarcoma Protein) führt zur Aktivierung verschiedener Target-Proteine und dadurch zur Zellproliferation (Lo and Hung, 2006)

Zusätzlich konnten Experimente aus dem Jahr 1990 bereits zeigen, dass die Zugabe von EGF zu humanen epidermalen Zellen aus der Vorhaut zu einer Steigerung der Keratinozytenproliferation führte (Marchese et al., 1990). Diese Beobachtungen konnten auch von Miroslav Blumberg in seiner Publikation bestätigt werden. Er kam zu dem Schluss, dass EGF die Proliferation, die Anheftung an der Kulturfläche sowie die Mobilität von Keratinozyten fördert (Blumberg, 2013).

Aufgrund dieser Forschungsergebnisse wurde überprüft, ob EGF auch in unseren Forschungsansätzen (n= 24) die Auswachs geschwindigkeit der Keratinozyten an den HF (positiv) beeinflussen kann. Bei der Applikation von EGF als Zellkulturzusatz zeigte sich jedoch ein inhomogenes Muster der Auswachszeiten. Zum Teil konnten die ersten Keratinozyten nach einer Inkubationszeit von 24 h beobachtet werden (bei Spender S4 mit n= 4 HF), auch sind aber auch viele HF unter diesen Bedingungen abgeschwommen oder es konnte insgesamt überhaupt kein Keratinozytenwachstum festgestellt werden (n= 10).

Eine Vermutung, warum EGF als Zellkulturzusatz hinsichtlich unserer Fragestellung nicht wie gewünscht funktioniert hat, könnte die Tatsache sein, dass in der zellulären Homöostase eine genau definierte Konzentration von EGF vorhanden sein muss, um die positiven, zellproliferativen Einflüsse zu stimulieren. Bei einer Überexpression von EGF kann es beim Menschen zur Entstehung verschiedener Tumore und Metastasen kommen (Lo and Hung, 2006). Eventuell hat die

Konzentration des verwendeten EGF (20 ng/ml) einige Zellen des HF zu stark proliferieren lassen, wodurch zum Schutz ein Absterbeprozess eingeleitet wurde.

4.1.6.5 DAPT

Wie im Ergebnisteil beschrieben, zeigte sich die Verwendung des Notch-Inhibitor DAPT als wirksamster Zellkulturzusatz. Der Median-Wert konnte durch dessen Zugabe zum HF- Grundmedium bei allen vier Spendern (n= 24 HF) auf 24 h gesenkt werden.

Der Notch Signalweg (siehe **Abbildung 51**) ist ein bedeutender und sehr gut konservierter Signalweg, welcher für die Interaktion benachbarter Zellen von immenser Bedeutung ist, sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch beim Erwachsenen (Bray, 2006). Bedeutend ist dieser Signalweg in der interzellulären Kommunikation und er reguliert diverse Zellfunktionen wie z.B. die Zellproliferation und -differenzierung, den Zelltod und die Selbsterneuerung von Stammzellen (Jiang et al., 2014, Marquez-Exposito et al., 2018). Innerhalb dieses Signalwegs spielt das Enzym γ -Secretase eine entscheidende Rolle, da hierdurch die intrazelluläre Transkription der verschiedenen Zielgene aktiviert wird (Marquez-Exposito et al., 2018).

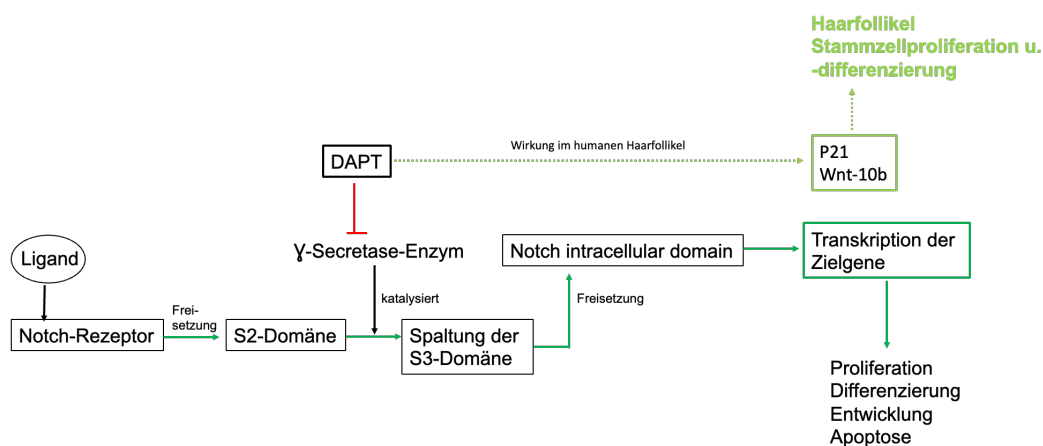


Abbildung 51: Notch-Signalweg, das γ -Secretase-Enzym katalysiert die Freisetzung der Notch intracelluläre Domäne und sorgt über die Transkription verschiedener Zielgene für eine Proliferation, Differenzierung, Entwicklung und Apoptose (Marquez-Exposito et al., 2018) **DAPT** als γ -Secretase-Inhibitor sorgt im Haarfollikel über die Transkription der Proteine p21 und Wnt-10b überraschenderweise für eine Stammzellproliferation und -differenzierung (Jiang et al., 2014)

Das von uns als Zellkulturzusatz verwendete DAPT ist ein γ -Secretase-Inhibitor und sorgt somit für eine Inhibierung des Notch-Signalwegs an sich.

Es konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass eine Inhibierung von Notch die humane HF-Stammzellproduktion fördert und gleichzeitig die Differenzierung dieser inhibiert. Dies geschieht laut Jiang et al. durch eine Regulierung der Proteine p21 und Wnt-10b (Jiang et al., 2014). Ein modulierender Einfluss von DAPT auf die HF-Stammzellen konnte durch Jian et al. nachgewiesen werden (Jiang et al., 2014).

Die Forscher untersuchten dabei die isolierte Bulge Region, also den Bereich des HF mit der Ausbuchtung und der Stammzellnische (siehe **Abbildung 2** und **1.1.2**) von operativ gewonnenen Haarbiopsien aus dem Kopfbereich. Diese Bulge area wurde inkubiert und durch Zugabe von verschiedenen DAPT-Konzentrationen das Auswachsen der HF-Stammzellen provoziert. Dabei brachte die Verwendung von DAPT in einer Konzentration von 20 μ M die besten Ergebnisse (Jiang et al., 2014).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass DAPT auch bei unseren Versuchsansätzen mit komplett inkubierten HF einen positiven Einfluss auf das Auswachsen der Keratinozyten im Bereich der äußeren Wurzelscheide hat und dass DAPT mit einer Konzentration von 10 μ m bei uns zu einer deutlichen Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten führt, bei den Spendern S1, S2 und S4 von einem Median-Wert von 48 h auf 24 h, bei Spender S3 gar von einem Median-Wert von ursprünglich 72 h auf 24 h.

Die Verwendung von DAPT als Zellkulturzusatz zu dem verwendeten Zellkulturmedium bringt daher großes Potential mit sich, die Zeitspanne bis zum Auswachsen der Keratinozyten zu verkürzen und somit den kompletten Vorgang der Gewinnung von Keratinozyten für die spätere Reprogrammierung dieser zu iPSZ zu beschleunigen.

Durch diese eindrucksvollen Ergebnisse in der Reduzierung der Zeitspanne empfehlen wir die Zugabe von 10 μ M DAPT, zusammen mit 20 ng/ml FGF2 und 10 μ M Y27632 zu dem HF-Grundmedium.

4.1.6.6 Ausblick

Da die Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten für den Prozess der Kultivierung von Keratinozyten für die spätere Gewinnung von iPSZ ein großes Potential für die Forschung innehält, sollten im Verlauf weitere Zellkulturzusätze getestet werden.

So könnte beispielsweise die Verwendung von CHIR99021 (= Glycogensynthasekinase 3 Inhibitor) in Erwägung gezogen werden, da bei hämatopoetischen Stammzellen seine Aktivierung der Differenzierung gezeigt werden konnte (Zarrabi et al., 2020).

Auch die Verwendung des Stem cell factor-Proteins oder des FMS-kinase 3 ligand-Proteins könnte getestet werden, welche über verschiedene Zwischenstufen die CyclinD-Cdk4/6 und CyclinE-Cdk2 Kinase aktivieren und somit die Zellproliferation fördern (Zarrabi et al., 2020).

Hinsichtlich der Versuchsreihen zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum ersten Auswachsen der Keratinozyten lässt sich zusammenfassend sagen, dass ...

- die Verwendung von 10 µM DAPT als Zellkulturzusatz zum HF-Medium eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten bietet.
- die anderen verwendeten Zellkulturzusätze keine Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten erbrachten.
- bei den Kontroll-Versuchen, bei denen lediglich 1,5ml HF-Medium ohne die Zugabe von FGF und Y27632 verwendet wurde, an etwa 42 % der insgesamt 24 inkubierten HF Keratinozyten auswachsen; im Vergleich dazu konnte bei der Verwendung des HF-Mediums, bei dem 20 ng/ml FGF2 und 10 µM Y27632 zugefügt waren, an 47,5% der insgesamt 162 inkubierten HF das Auswachsen von Keratinozyten beobachtet werden.
- die Verwendung anderer Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne getestet werden sollte.

4.2 Expression von Keratinen in humanen Haarfollikeln und primär ausgewachsenen Keratinozyten

Für die Untersuchung der Expression der Keratine in den HF und den auswachsenden Keratinozyten wurden zum einen Immunfluoreszenzfärbungen und zum anderen eine Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Das Ziel war es herauszufinden, aus welcher Schicht der HF die ersten Keratinozyten auswachsen.

Die Keratin-Familie besteht aus 54 Proteinen, die in zwei Gruppen (saure und basische Keratine) eingeteilt werden und hinsichtlich ihrer Funktionen in der Haut und den Haaren nochmals in drei Untergruppen unterteilt werden können. Hier unterscheidet man zwischen den „einfachen Keratinen“, den „Barriere-Keratinen“ und den „Struktur-Keratinen“ (siehe 1.3; (Haines and Lane, 2012)). Für uns besonders interessant sind die Keratine, die in den HF vorkommen, insgesamt haben wir elf verschiedene Keratine auf der Proteinebene angeschaut, vier davon auf der RNA- Ebene.

Tabelle 24: Zusammenfassung Expression der Keratine (K) in humanen Haarfollikeln (HF) und den primär auswachsenden Keratinozyten; Sortierung der Keratine absteigend nach dem Molekulargewicht geordnet; - heißt nicht exprimiert, + heißt exprimiert; Anzahl der + bei der RNA Expression gibt „Stärke“ der Expression an

Keratin	Lokalisation im HF	Expression HF		Expression Keratinozyten	
		Protein	RNA	Protein	RNA
K1	Innere Wurzelscheide	Nicht gemessen		-	Nicht gemessen
K(6/7)5	Innere u. äußere Wurzelscheide + Begleitschicht	Nicht gemessen		+	Nicht gemessen
K10	Innere Wurzelscheide	-	+	-	++
K5	Basalzellen äußere Wurzelscheide	+	+++	+	++

K6	Äußere Wurzelscheide	Nicht gemessen		+	Nicht gemessen
K14	Basalzellen äußere Wurzelscheide	+	++	+	+++
K15	Basalzellen äußere Wurzelscheide	Nicht gemessen		+	Nicht gemessen
K25	Innere Wurzelscheide	Nicht gemessen		-	Nicht gemessen
K16	Äußere Wurzelscheide	Nicht gemessen		-	Nicht gemessen
K17	Äußere Wurzelscheide	Nicht gemessen		+	Nicht gemessen
K19	Ausbuchtung – äußere Wurzelscheide	-	-	-	-

Die **Keratine 1** und **10** werden in der Epidermis in den suprabasalen Zellen produziert und sind für die postmitotische Differenzierung der Keratinozyten verantwortlich (Bragulla and Homberger, 2009). Zusätzlich erwähnen Langenbein et al. in ihrer Publikation, dass Keratin 1 und Keratin 10 in der inneren Wurzelscheide von HF nachweisbar sind (Langbein et al., 2006). Hinsichtlich Keratin 10 konnte durch Koch und Roop festgestellt werden, dass dieses Keratin in postmitotischen keratinisierten Zellen, also ein Zustand von Zellen, die sich nach der Differenzierung nicht mehr weiter teilen, in den suprabasalen Schichten der Epidermis exprimiert ist (Koch and Roop, 2004). Auch in der Publikation von Wüstner et al. konnte in den dort gefärbten Keratinozyten Keratin 10 durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden (Wustner et al., 2022). Die positiv gefärbten Zellen zeigen jedoch, dass sie sich bereits in einem postmitotischen Zustand befunden haben (Wustner et al., 2022). Weder Keratin 1 (siehe **Abbildung 38**) noch Keratin 10 (siehe **Abbildung 42**) konnte bei uns in den ersten auswachsenden Keratinozyten bei der Färbung

nachgewiesen werden. Auch die Färbung der HF mit Keratin 10 zeigte sich negativ. Bei der Genexpressionsanalyse der Keratinozyten zeigte sich jedoch ein recht hoher Wert für Keratin 10 (siehe **Abbildung 43** und **Abbildung 44**). Bei der Genexpressionsanalyse der HF selbst war der Wert für Keratin 10 deutlich niedriger (siehe **Abbildung 33**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Keratin 1 und 10 in unseren analysierten Zellen auf Proteinebene nur in postmitotischen Zellen aufzufinden sind. Die von uns gefärbten Keratinozyten befanden sich in einem sehr frühen Stadium ihrer Differenzierung, sie waren gerade erst an den HF ausgewachsen oder ggf. nur ein paar wenige Tage alt. Bei unseren IF-Färbungen konnten also keine postmitotischen Keratinozyten gefärbt werden, wodurch der fehlende Nachweis der Keratine 1 und 10 in unseren IF-Färbungen erklärt werden kann. Hinsichtlich der Genexpressionsanalyse, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurde, konnte in den untersuchten Keratinozyten eine hohe Keratin 10-Expression nachgewiesen werden. Eine Vermutung für diese kontroversen Ergebnisse ist, dass die Keratinozyten, die für die Genexpressionsanalyse verwendet wurden, über zwei bis drei Wochen kultiviert wurden und nicht nur wenige Tage wie die IF analysierten Keratinozyten. Um eine ausreichende Menge an Keratinozyten-RNA zu bekommen, ist eine hohe Anzahl an Zellen notwendig. Um diese Zellmenge zu erreichen, wurden die Keratinozyten über mehrere Wochen kultiviert. Im Laufe dieser Kultivierung durchlaufen die Keratinozyten viele Zellzyklen, wobei einige Zellen nach gewisser Zeit ihre Teilung einstellen und postmitotisch werden. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Genexpression von Keratin 10 so viel höher ist als die Proteinexpression.

Das Vorhandensein von **Keratin 6** konnte in verschiedenen Epithelien sowie auch in den Zellen der äußeren Wurzelschicht von HF nachgewiesen werden (Bragulla and Homberger, 2009, Langbein et al., 2006). Ebenso konnten wir durch unsere Forschung den Nachweis erbringen, dass Keratin 6 auch in den

ersten an den HF auswachsenden Keratinozyten exprimiert ist. Mit dem Antikörper K6/75 können die Keratine 6 und 75 zeitgleich gefärbt werden. Die Verwendung dieses Antikörpers zeigte sich in unseren IF-Färbungen positiv. Der alleinige Nachweis von Keratin 6 konnte, wie oben beschrieben, bereits erbracht werden, aber auch der Nachweis von Keratin 75 in den ersten auswachsenden Keratinozyten gelang somit.

Das **Keratin 75** stellt laut Bragulla und Homberger ein spezifisches Keratin der inneren Wurzelscheide von humanen HF dar (Bragulla and Homberger, 2009) und wurde von verschiedenen Forschungsgruppen in der Begleitschicht humaner HF und im Mark von Genitalbehaarung und Bartbehaarung nachgewiesen (Langbein et al., 2006, Wang et al., 2003). Zusätzlich konnte Keratin 75 jedoch auch in der äußeren Wurzelscheide von HF nachgewiesen werden, die hierzu vorliegenden Daten wurden jedoch noch nicht veröffentlicht. Nun konnte durch die Forschung innerhalb dieser Dissertation Keratin 75 auch in den ausgewachsenen Keratinozyten nachgewiesen werden.

Keratin 5 wird mit seinem „Partner“ Keratin 14 (siehe unten) laut Bragulla und Homberger in den basalen Zellen der Epidermis produziert (Bragulla and Homberger, 2009) und konnte durch Porter et al. bereits im Jahr 2000 durch eine immunhistochemische Färbung in der äußeren Wurzelscheide von menschlichen HF nachgewiesen werden (Porter et al., 2000). Auch bei unseren IF-Färbungen wurde Keratin 5 in den HF im Bereich der äußeren Wurzelscheide nachgewiesen. Auch die ersten auswachsenden Keratinozyten sind für Keratin 5 positiv (siehe u.a. **Abbildung 34** und **Abbildung 42**). Die Genexpressionsanalyse sowohl der HF als auch der Keratinozyten (siehe **Abbildung 33**, **Abbildung 43** und **Abbildung 44**) bestätigte dieses Bild, die Expression von Keratin 5 zeigte sich recht deutlich.

Keratin 14 wurde in einer Publikation als fundamentales Keratin bezeichnet, das in allen Keratinozyten des Menschen vorkommt (Porter et al., 2000). Hinsichtlich

der humanen Haarfollikel kann Keratin 14 mit zunehmendem Differenzierungsgrad der HF-Zellen in den basalen Zellschichten der äußeren Wurzelscheide nachgewiesen werden (Bragulla and Homberger, 2009). Auch in der Publikation von Wüstner et al. konnte bereits gezeigt werden, dass Keratinozyten, welche aus humanen HF auswachsen, Keratin 14 positiv sind (Wustner et al., 2022). Durch unsere Versuche konnte Keratin 14 also sowohl in den HF (im Bereich der äußeren Wurzelscheide, siehe **Abbildung 32**) als auch in den ersten auswachsenden Keratinozyten (siehe **Abbildung 38**) durch die immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden. Auch hinsichtlich der Genexpressionsanalyse konnte das Keratin 14 sowohl in den HF auf der RNA-Ebene (siehe **Abbildung 33**) als auch in den ersten auswachsenden Keratinozyten deutlich nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 43** und **Abbildung 44**).

Das Vorhandensein von **Keratin 15** wurde sowohl in den Basalzellen von mehrschichtigen Epithelien als auch in den basalen Zellen der äußeren Wurzelscheide von HF bewiesen (Bragulla and Homberger, 2009). Diese Beobachtungen sind in sich schlüssig, da sich die Basalzellschicht der Haut nach innen in den HF fortsetzt und dort dann die äußere, basale Schicht der äußeren Wurzelscheide bildet. Auch erste Keratinozyten, die mutmaßlich aus der äußeren Wurzelscheide auswachsen, sind in unseren Versuchen Keratin 15 positiv, was die Beobachtungen früherer Publikationen bestätigt (Langan et al., 2015). So konnte auch durch unsere IF-Färbung Keratin 15 in den auswachsenden Keratinozyten nachgewiesen werden.

Keratin 25 konnte in den ersten auswachsenden Keratinozyten nicht detektiert werden, wenn auch von Langanbein et al. 2006 beschrieben wurde, dass dieses Keratin in den epithelialen Zellen aller drei Anteile der inneren Wurzelscheide (Kutikula, Henle-Schicht und Huxley-Schicht) der HF produziert wird (Langbein et al., 2006). Auch Bragulla und Homberger beschreiben, dass Keratin 25 spezifisch für die innere Wurzelscheide der HF ist (Bragulla and Homberger, 2009). Eine Vermutung, warum die ersten Keratinozyten kein Keratin 25 exprimieren ist,

dass die Keratinozyten aus der äußeren Wurzelscheide des HF auswachsen und nicht aus der inneren, in der sich Keratin 25 findet.

In der Literatur wurden gezeigt, dass die beiden **Keratine 16** und **17** eine wichtige Rolle in dem Wachstumszyklus der HF spielen und beide in der äußeren Wurzelscheide der HF zu finden sind (Langbein et al., 2006). Keratin 16 markiert in den HF einen aktivierten Zustand der Keratinozyten, welche fähig sind zu migrieren, extrazelluläre Matrix zu produzieren und zu hyperproliferieren, und ist darüber hinaus in den Haarzyklus involviert, mit einem Expressionsmaximum zwischen der katagenen und anagenen Phase (Bragulla and Homberger, 2009).

Keratin 17 fördert das Wachstum der HF, indem der pro-apoptotische Einfluss des Tumornekrosefaktors- α geschwächt wird (Gu and Coulombe, 2007).

Durch unsere Forschungsversuche konnte nachgewiesen werden, dass Keratin 17 in den ersten auswachsenden Keratinozyten an den HF exprimiert ist. Keratin 16 jedoch konnte in den ersten auswachsenden Keratinozyten nicht nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte zum einen sein, dass sich die ersten auswachsenden Keratinozyten noch nicht in einem aktivierten Zustand befinden oder auch die Tatsache, dass Keratin 16 sein Expressionsmaximum zwischen der katagenen und anagenen Phase hat (Bragulla and Homberger, 2009), wir jedoch nur HF der anagenen Phase untersuchten. Eventuell ist bei den anagenen HF die Expression von Keratin 16 derart niedrig, dass das Keratin nicht in den Keratinozyten, die aus diesen HF auswachsen, nachgewiesen werden kann.

Keratin 19 konnte in den ersten auswachsenden Keratinozyten nicht detektiert werden (siehe **Abbildung 40**), obwohl in der Literatur angegeben wird, dass Keratin 19 in vielen verschiedenen Strukturen wie z.B. humanen epidermalen Keratinozyten und Merkel-Zellen bereits nachgewiesen wurde (Bragulla and Homberger, 2009). Ebenso zeigte sich Keratin 19 in der Ausbuchtung von HF bereits in anderen Publikationen positiv (Martel et al., 2022).

Jedoch konnte in den von uns gefärbten HF keine Expression von Keratin 19 nachgewiesen werden.

Die fehlende Expression in der IF-Färbung bestätigte sich auch durch die Genexpressionsanalyse, bei der Keratin 19 bei beiden Spendern die schwächste Expression von den untersuchten Keratinen aufwies (siehe **Abbildung 43** und **Abbildung 44**). Auch bei der Genexpressionsanalyse der HF zeigte Keratin 19 einen sehr geringen Wert (siehe **Abbildung 33**). Eine Vermutung, warum Keratin 19 weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, könnte die Tatsache sein, dass die Synthese von Keratin 19 in der interfollikulären Epidermis mit zunehmendem Alter deutlich abnimmt (Bragulla and Homberger, 2009). In dieser Publikation wird beschrieben, dass bei 17 bis 42 jährigen Männern nur noch 0,1 % der basalen Zellen Keratin 19 synthetisieren (Bragulla and Homberger, 2009). Da die Spender der Keratinozyten und der HF ebenfalls zu dieser Altersgruppe zählen, könnte vermutet werden, dass auch die Produktion von Keratin 19 in den Haarfollikeln mit zunehmenden Alter abnimmt und deswegen kein Nachweis in den Immunfluoreszenzfärbungen und der Genexpressionsanalyse gelang.

Ebenfalls Grund für die von uns beobachtete fehlende Expression im HF könnte die Tatsache sein, dass bei den gezupften HF, die von uns untersucht wurden, die Ausbuchtung, die mit der Insertion des M. arrector pilii assoziiert ist, nicht isoliert werden konnte.

Zusammenfassend zur Expressionsanalyse der Keratine auf RNA- und Proteinebene in HF und ausgewachsenen Keratinozyten kann man Folgendes schlussfolgern:

- ➔ Die **Keratinozyten**, die an den HF auswachsen, wachsen vermutlich aus der **äußeren Wurzelscheide** der HF aus.
 - Die Keratine 14, 15, 16, 17, 5 und 6 kommen in der äußeren Wurzelscheide der HF vor und sind auch alle bis auf Keratin 16 in den ersten auswachsenden Keratinozyten exprimiert.
 - Keratin 75 kann sowohl in der inneren Wurzelscheide, in der Companion Layer (Begleitschicht) als auch in der äußeren Wurzelscheide der HF nachgewiesen werden und wird auch in den ersten auswachsenden Keratinozyten exprimiert.
- ➔ Die Keratine 1, 10, und 25 sind in der inneren Wurzelscheide der HF exprimiert und konnten in den ersten auswachsenden Keratinozyten nicht nachgewiesen werden.
- ➔ Keratin 19 konnte bisher nur im Bereich der Ausbuchtung der HF nachgewiesen werden, diese ist bei unseren HF nicht nachweisbar, somit sind sowohl die HF als auch die Keratinozyten negativ für Keratin 19.
- ➔ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass unsere jungen Keratinozyten nicht postmitotisch sind, sondern teilungsaktiv (K1 und K10 negativ).

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Dissertation war es, die humanen Haarfollikel (HF) und ersten auswachsenden Keratinozyten genauer zu charakterisieren. Dabei wurden verschiedene Parameter wie der Ort und die Zeit bis zum Auswachsen angeschaut sowie morphologische Veränderungen über die Zeit der Inkubation. Ziel war es weiterhin, die Zeitspanne bis zum ersten Erscheinen der Keratinozyten durch Zugabe von kleinen Molekülen zu reduzieren. Darüber hinaus wurden die HF und die an ihnen auswachsenden Keratinozyten in Zellkulturansätzen und Immunfluoreszenzfärbungen untersucht und charakterisiert. Zur Analyse der Haare und Keratinozyten auf RNA-Ebene wurde zusätzlich eine qRT-PCR durchgeführt.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse erhofft man sich, die Gewinnung von induziert pluripotenten Stammzellen (iPSZ) aus gezupften HF zu beschleunigen, die Prozedur weniger anfällig zu gestalten und damit den gesamten Prozess zu vereinfachen. Die Gewinnung dieser iPSZ ist für die heutige Forschung insofern immens wichtig, dass durch sie die Modellierung von Krankheitsmodellen erforscht werden kann, ein besseres Verständnis der verschiedenen Krankheiten erreicht werden kann und auch die Erprobung verschiedenster Therapieansätze möglich ist.

Bei der von uns gewählten Methode werden humane HF extrahiert und kultiviert, um das Auswachsen von Keratinozyten an diesen zu provozieren. Diese können dann im weiteren Verlauf zu eben diesen iPSZ „reprogrammiert“ werden. Diese Methode stellt hierbei unter den bereits etablierten Verfahren zur Gewinnung der iPSZ (z.B. aus Hautbiopsien) ein minimalinvasives, beinahe schmerzfreies, einfach durchführbares und sehr praktikables Verfahren dar.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte festgestellt werden, dass die extrahierten und kultivierten HF der anagenen Wachstumsphase eine deutliche morphologische Varianz untereinander aufwiesen, genauso wie die an ihnen auswachsenden Keratinozyten. Ebenfalls konnte analysiert und charakterisiert werden, dass die kultivierten HF während ihrer Inkubation eine deutliche Veränderung hinsichtlich ihrer Morphologie durchlaufen, die äußerer Wurzelscheide der HF wird in diesem Prozess dicker und unregelmäßiger hinsichtlich ihrer Form, was von uns

im Rahmen dieser Dissertation erstmals genau beschrieben und quantifiziert wurde.

Die Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten wurde bereits in diversen Publikationen oberflächlich angeschnitten, durch unsere Forschung konnte eine spezifischere und genauere Analyse der Auswachszeitpunkte erreicht werden; zeitgleich konnte auch der Ort, an dem die ersten Keratinozyten an den HF auswachsen, erstmals genauer erforscht und beschrieben werden.

Da eine schnelle Gewinnung und Kultivierung der an den HF auswachsenden Keratinozyten für die Forschung von großer Bedeutung ist, wurde untersucht, ob die Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten durch Veränderung des Grundmediums beeinflusst werden kann. Es wurden Zusätze getestet, durch die in verschiedenste Signalwege eingegriffen werden konnte. Deren Ziel war es die Proliferation der Zelle zu erhöhen, wodurch eine schnelle Auswachs geschwindigkeit und erhöhte Erfolgsquote hinsichtlich der Anzahl der auswachsenden Keratinozyten erreicht werden sollte. Unter den insgesamt fünf getesteten Zellkulturzusätzen stellte sich die Verwendung von DAPT (Notch-Inhibitor) als vielversprechendster Zusatz heraus, da bei dessen Verwendung in all unseren Versuchen ein Auswachsen der ersten Keratinozyten im Median nach bereits 24 h Inkubation beobachtet werden konnte. Die Erfolgsquote von DAPT lag darüber hinaus bei 79,2 %.

Für eine weitere genauere Charakterisierung und Untersuchung der HF und Keratinozyten auf Protein- und RNA-Ebene wurde die Expression verschiedenster Keratine in den HF und Keratinozyten untersucht. Die Keratin-Familie nimmt eine wichtige Rolle innerhalb der Epidermis (in welche die HF eingebettet sind) und auch in den Haaren selbst ein, daher sollten bestimmte Mitglieder dieser Protein-Familie genauer erforscht werden. Das primäre Ziel hierbei war es herauszufinden, aus welcher Schicht der HF die ersten Keratinozyten genau auswachsen und welche Keratine die HF und Keratinozyten exprimieren. Durch die Forschung innerhalb dieser Dissertation ergibt sich die Vermutung, dass die Keratinozyten aus der äußeren Wurzelscheide der HF auswachsen.

Folglich können die Ergebnisse aus dieser Dissertation für andere Forschende genutzt werden, um den Prozess der Gewinnung von Keratinozyten für die Reprogrammierung zu iPSZ zu beschleunigen und zu vereinfachen. Die generierten iPSZ können zur Erforschung verschiedenster Krankheiten, deren Modellierung und Therapie genutzt werden.

Des Weiteren können auch verschiedene Krankheiten, die HF selbst und direkt betreffend, durch die genaue Charakterisierung der HF und den an ihnen auswachsenden Keratinozyten durch die Grundlagen aus dieser Dissertation ggf. besser verstanden und erforscht werden.

6 Literaturverzeichnis

- AASEN, T. & IZPISUA BELMONTE, J. C. 2010. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 5, 371-82.
- AASEN, T., RAYA, A., BARRERO, M. J., GARRETA, E., CONSIGLIO, A., GONZALEZ, F., VASSENA, R., BILIC, J., PEKARIK, V., TISCORNIA, G., EDEL, M., BOUE, S. & IZPISUA BELMONTE, J. C. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 26, 1276-84.
- ALONSO, L. & FUCHS, E. 2006. The hair cycle. *J Cell Sci*, 119, 391-3.
- BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. & CLARK, B. J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21, 389-95.
- BARONI, A., BUOMMINO, E., DE GREGORIO, V., RUOCCO, E., RUOCCO, V. & WOLF, R. 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, 30, 257-62.
- BIKLE, D. D., XIE, Z. & TU, C. L. 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 7, 461-472.
- BLUMENBERG, M. 2013. Profiling and metaanalysis of epidermal keratinocytes responses to epidermal growth factor. *BMC Genomics*, 14, 85.
- BRAGULLA, H. H. & HOMBERGER, D. G. 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 214, 516-59.
- BRAY, S. J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 678-89.
- DETMAR, M., SCHAART, F. M., BLUME, U. & ORFANOS, C. E. 1993. Culture of hair matrix and follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 101, 130S-134S.
- DRISKELL, R. R., LICHTENBERGER, B. M., HOSTE, E., KRETZSCHMAR, K., SIMONS, B. D., CHARALAMBOUS, M., FERRON, S. R., HERAULT, Y., PAVLOVIC, G., FERGUSON-SMITH, A. C. & WATT, F. M. 2013. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, 504, 277-281.
- FORE, J. 2006. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*, 52, 24-35; quiz 36-7.
- GAO, L., CHEN, E. Q., ZHONG, H. B., XIE, J., SONG, H. Z., ZHAO, X. B., LIN, J. R., LIU, Q., WANG, S., WU, W. Y., ZHAO, R. C. & LIAO, X. H. 2022. Large-scale isolation of functional dermal papilla cells using novel surface marker LEPTIN Receptor. *Cytometry A*, 101, 675-681.
- GRICE, E. A. & SEGRE, J. A. 2011. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 9, 244-53.
- GU, L. H. & COULOMBE, P. A. 2007. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 13-23.
- HAINES, R. L. & LANE, E. B. 2012. Keratins and disease at a glance. *Journal of Cell Science*, 125, 3923-3928.
- HEITMAN, N., SENNETT, R., MOK, K. W., SAXENA, N., SRIVASTAVA, D., MARTINO, P., GRISANTI, L., WANG, Z., MA'AYAN, A., ROMPOLAS, P.

- & RENDL, M. 2020. Dermal sheath contraction powers stem cell niche relocation during hair cycle regression. *Science*, 367, 161-166.
- JIANG, J., MIAO, Y., XIAO, S., ZHANG, Z. & HU, Z. 2014. DAPT in the control of human hair follicle stem cell proliferation and differentiation. *Postepy Dermatol Alergol*, 31, 201-6.
- JUNG, H. J. & SUH, Y. 2014. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet*, 5, 472.
- KLINGENSTEIN, S., KLINGENSTEIN, M., KLEGER, A. & LIEBAU, S. 2020. From Hair to iPSCs—A Guide on How to Reprogram Keratinocytes and Why. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 55, e121.
- KOCH, P. J. & ROOP, D. R. 2004. The role of keratins in epidermal development and homeostasis--going beyond the obvious. *J Invest Dermatol*, 123, x-xi.
- LANGAN, E. A., PHILPOTT, M. P., KLOEPPER, J. E. & PAUS, R. 2015. Human hair follicle organ culture: theory, application and perspectives. *Exp Dermatol*, 24, 903-11.
- LANGBEIN, L., ROGERS, M. A., PRAETZEL-WUNDER, S., HELMKE, B., SCHIRMACHER, P. & SCHWEIZER, J. 2006. K25 (K25irs1), K26 (K25irs2), K27 (K25irs3), and K28 (K25irs4) represent the type I inner root sheath keratins of the human hair follicle. *J Invest Dermatol*, 126, 2377-86.
- LO, H. W. & HUNG, M. C. 2006. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer*, 94, 184-8.
- MARCHESE, C., RUBIN, J., RON, D., FAGGIONI, A., TORRISI, M. R., MESSINA, A., FRATI, L. & AARONSON, S. A. 1990. Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes: differentiation response distinguishes KGF from EGF family. *J Cell Physiol*, 144, 326-32.
- MARQUEZ-EXPOSITO, L., CANTERO-NAVARRO, E., LAVOZ, C., FIERRO-FERNÁNDEZ, M., POVEDA, J., RAYEGO-MATEOS, S., RODRIGUES-DIEZ, R. R., MORGADO-PASCUAL, J. L., OREJUDO, M., MEZZANO, S. & RUIZ-ORTEGA, M. 2018. Could Notch signaling pathway be a potential therapeutic option in renal diseases? *Nefrologia (Engl Ed)*, 38, 466-475.
- MARTEL, J. L., MIAO, J. H. & BADRI, T. 2022. Anatomy, Hair Follicle. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.

- MARTINO, P. A., HEITMAN, N. & RENDL, M. 2021. The dermal sheath: An emerging component of the hair follicle stem cell niche. *Exp Dermatol*, 30, 512-521.
- NORMAND, J. & KARASEK, M. A. 1995. A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 31, 447-55.
- OH, J. W., KLOEPPER, J., LANGAN, E. A., KIM, Y., YEO, J., KIM, M. J., HSI, T. C., ROSE, C., YOON, G. S., LEE, S. J., SEYKORA, J., KIM, J. C., SUNG, Y. K., KIM, M., PAUS, R. & PLIKUS, M. V. 2016. A Guide to

- Studying Human Hair Follicle Cycling In Vivo. *J Invest Dermatol*, 136, 34-44.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PORTER, R. M., LUNNY, D. P., OGDEN, P. H., MORLEY, S. M., MCLEAN, W. H., EVANS, A., HARRISON, D. L., RUGG, E. L. & LANE, E. B. 2000. K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Lab Invest*, 80, 1701-10.
- PROST-SQUARCIONI, C. 2006. [Histology of skin and hair follicle]. *Med Sci (Paris)*, 22, 131-7.
- RAAB, S., KLINGENSTEIN, M., LIEBAU, S. & LINTA, L. 2014. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int*, 2014, 768391.
- RE, S., DOGAN, A. A., BEN-SHACHAR, D., BERGER, G., WERLING, A. M., WALITZA, S. & GRÜNBLATT, E. 2018. Improved Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Hair Derived Keratinocytes - A Tool to Study Neurodevelopmental Disorders as ADHD. *Front Cell Neurosci*, 12, 321.
- RIDGE, K. M., ERIKSSON, J. E., PEKNY, M. & GOLDMAN, R. D. 2022. Roles of vimentin in health and disease. *Genes Dev*, 36, 391-407.
- SADAGURSKI, M., YAKAR, S., WEINGARTEN, G., HOLZENBERGER, M., RHODES, C. J., BREITKREUTZ, D., LEROITH, D. & WERTHEIMER, E. 2006. Insulin-like growth factor 1 receptor signaling regulates skin development and inhibits skin keratinocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 26, 2675-87.
- SCHNEIDER, M. R., SCHMIDT-ULLRICH, R. & PAUS, R. 2009. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Current Biology*, 19, R132-R142.
- SCHWEIZER, J., BOWDEN, P. E., COULOMBE, P. A., LANGBEIN, L., LANE, E. B., MAGIN, T. M., MALTAIS, L., OMARY, M. B., PARRY, D. A., ROGERS, M. A. & WRIGHT, M. W. 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174, 169-74.
- SEITZ, I. P., ACHBERGER, K., LIEBAU, S. & FISCHER, M. D. 2016. [Stem Cells for Retina Replacement]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 233, 1350-1356.
- TAGAMI, H. 2008. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Int J Cosmet Sci*, 30, 413-34.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- THOM, E. 2016. Stress and the Hair Growth Cycle: Cortisol-Induced Hair Growth Disruption. *J Drugs Dermatol*, 15, 1001-4.
- TOJO, M., HAMASHIMA, Y., HANYU, A., KAJIMOTO, T., SAITOH, M., MIYAZONO, K., NODE, M. & IMAMURA, T. 2005. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci*, 96, 791-800.
- VAN DER VALK, J. 2022. Fetal bovine serum-a cell culture dilemma. *Science*, 375, 143-144.
- WANG, Z., WONG, P., LANGBEIN, L., SCHWEIZER, J. & COULOMBE, P. A. 2003. Type II epithelial keratin 6hf (K6hf) is expressed in the companion

- layer, matrix, and medulla in anagen-stage hair follicles. *J Invest Dermatol*, 121, 1276-82.
- WUSTNER, L. S., KLINGENSTEIN, M., FREY, K. G., NIKBIN, M. R., MILAZZO, A., KLEGER, A., LIEBAU, S. & KLINGENSTEIN, S. 2022. Generating iPSCs with a High-Efficient, Non-Invasive Method-An Improved Way to Cultivate Keratinocytes from Plucked Hair for Reprogramming. *Cells*, 11.
- YAMAUCHI, K. & KUROSAKA, A. 2009. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the expression of alkaline phosphatase and insulin-like growth factor-1 in human primary dermal papilla cell culture and maintains mouse hair bulbs in organ culture. *Arch Dermatol Res*, 301, 357-65.
- ZARRABI, M., AFZAL, E., ASGHARI, M. H. & EBRAHIMI, M. 2020. Combination of SB431542, Chir9901, and Bpv as a novel supplement in the culture of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 11, 474.
- ZHANG, C., LEE, H. J., SHRIVASTAVA, A., WANG, R., MCQUISTON, T. J., CHALLBERG, S. S., POLLOK, B. A. & WANG, T. 2018. Long-Term In Vitro Expansion of Epithelial Stem Cells Enabled by Pharmacological Inhibition of PAK1-ROCK-Myosin II and TGF-beta Signaling. *Cell Rep*, 25, 598-610 e5.
- ZHANG, H., FU, X., AO, Y., NAN, M., QIU, Z., JIA, X., XIAO, Y., LIU, D. & GUO, X. 2021. ANXA1 affects murine hair follicle growth through EGF signaling pathway. *Gene*, 771, 145343.
- ZHANG, P., KLING, R. E., RAVURI, S. K., KOKAI, L. E., RUBIN, J. P., CHAI, J. K. & MARRA, K. G. 2014. A review of adipocyte lineage cells and dermal papilla cells in hair follicle regeneration. *J Tissue Eng*, 5, 2041731414556850.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie unter Betreuung von Prof. Dr. Stefan Liebau durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch / in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Stefanie Klingenstein, Postdoktorandin und Dr. rer. nat. Moritz Klingenstein, Postdoktorand.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. rer. nat. Stefanie Klingenstein und Sabine Conrad von mir eigenständig durchgeführt. Die Versuche zur cDNA-Synthese, Pre-Amplifikation und der Fluidigm Lauf wurden von der technischen Assistentin Sabine Conrad durchgeführt, unter Mithilfe meinerseits.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Stefanie Klingenstein und Dr. rer. nat. Moritz Klingenstein durch mich. Die Berechnung der Signifikanzen hinsichtlich der Zugabe von Zellkulturzusätzen zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten wurde von Dr. rer. nat. Stefanie Klingenstein durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Liebau: Vielen Dank für die stets gute und freundliche Betreuung und die Möglichkeit, bei allen Fragen und Problemen auf Sie zuzukommen.

Ein weiteres, großes Dankeschön gilt meiner Mentorin Dr. Stefanie Klingenstein, da sie während des gesamten Prozesses immer ein offenes Ohr für mich hatte, stets mit Rat und Tat an meiner Seite stand und auch in persönlichen Belangen immer als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand. Vielen Dank, liebe Steffi, ohne Dich wäre die ganze Dissertation nie in dieser Form zustande gekommen.

Ein weiteres Dankeschön gilt meiner wissenschaftlichen Begleitperson Frau Dr. Andrea Wizenmann, auch hier konnte ich stets konstruktive Kritik und Vorschläge einholen. Die Tür zu Deinem Büro, liebe Andrea, stand mir immer offen, und auch die Diskussionen und Gespräche außerhalb meines Dissertationsthemas waren stets sehr interessant und aufschlussreich.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Moritz Klingenstein, der in den wöchentlichen Meetings immer guten Input gegeben hat und stets mit vollem Engagement dabei war.

Auch ein großes Dankeschön gilt Sabine Conrad, die als Labortechnische Assistentin bei allen Fragen ein offenes Ohr hatte und mir bei der Einarbeitung und bei Fragen zu meinen Versuchen stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Dasselbe gilt für alle Mitarbeiter des Instituts für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie der Universität Tübingen, mit denen man immer nette und gute Gespräche führen konnte, auch über die eigene Forschung hinausgehend. Vor allem Danke sagen möchte ich auch meiner „Mitdotorandin“ Jenny. Der stetige Austausch über unsere Forschungsfortschritte hat mir immer gut weitergeholfen und auch einen neuen Blickwinkel auf bestimmte Aspekte eröffnet.

Vielen Dank an alle für die gute und freundliche Aufnahme in Eurem Team, ich habe mich stets herzlich aufgehoben gefühlt.

Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls Michael, Berta-Luise und Friederike Kuwert. Auch Ihr habt mich immer unterstützt und mich in Eure Familie aufgenommen, vielen Dank dafür.

Das mitunter größte Dankeschön möchte ich meiner Familie aussprechen, meinen Eltern Kathrin und Michael und meinem Bruder Johannes. Ihr wart immer für mich da, auch schon während meines Studiums und jetzt auch in der Zeit meiner Promotion. Ihr habt mich immer bedingungslos unterstützt. Ich kann in Worten kaum ausdrücken, was mir das bedeutet, vielen Dank!

Last but not least gilt meine unendliche Dankbarkeit meinem Partner, Freund und Seelenverwandten Gregor. Seit mehreren Jahren gehen wir durch dick und dünn, haben die Hürden und Herausforderungen unserer Studiengänge gemeinsam gemeistert, uns immer gegenseitig unterstützt und dennoch auch die gemeinsame Zeit außerhalb der Uni genossen. Diese Unterstützung war mir auch während meiner gesamten Promotion gewiss. Ich konnte Dich immer fragen, auf Deinen ehrlichen Rat vertrauen, auch als Du selbst mitten in Deiner Prüfungsphase warst. Ich danke Dir von ganzem Herzen.

9 Anhang

Im Anhang befinden sich zusätzliche Diagramme und Bilder, die in der Dissertation selbst keine Erwähnung gefunden haben.

9.1 Anzahl der gezupften Haarfollikel und der Haarfollikel mit ausgewachsenen Keratinozyten

Zu der Gesamtanzahl der im Rahmen dieser Dissertation kultivierten Versuche ist in **Tabelle 25** genau aufgeführt, wie viele HF bei welchen Versuchen unter welchen Bedingungen kultiviert wurden (siehe 3.3).

Tabelle 25: Tabelle mit der Anzahl der inkubierten HF, Anzahl der HF mit ausgewachsenen Keratinozyten inkl. Prozentsatz, Anzahl der nach 96h abgeschwommenen HF inkl. Prozentsatz

	Anzahl der HF	Anzahl der HF mit ausgewachsenen Keratinozyten	HF mit Keratinozyten (%)	Abgeschwommene HF nach 96h Inkubation	Abgeschwommene HF (%)
HF kultiviert mit HF-Medium + Keratinozyten-Medium	162	77	47,5%	47	29,01%
HF kultiviert mit Ampuwa®-Medium (Negativkontrolle)	20	0	0%	9	45%
HF kultiviert mit HF-Medium + Zellkulturzusätze	123	72	58,54%	25	20,33%
HF kultiviert mit lediglich HF-Medium (ohne weitere Zusätze)	25	10	40%	7	28%
HF insgesamt	330	159	48,18%	88	26,7%

Dargestellt sind diese Zahlen zur Verdeutlichung und Anschauung nochmals im untenstehenden Diagramm **Abbildung 52**:

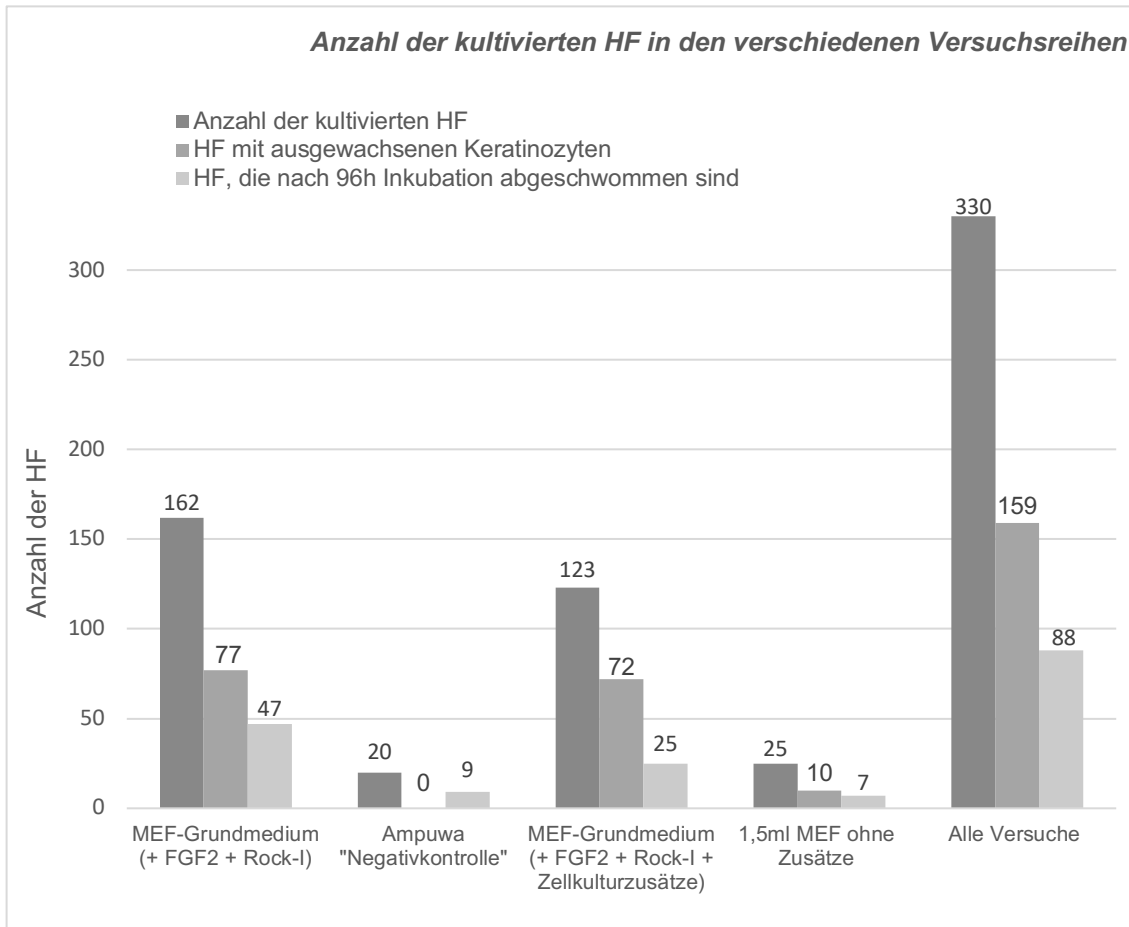


Abbildung 52: Anzahl der kultivierten HF insgesamt, der HF mit ausgewachsenen Keratinozyten und der HF, die nach 96h Inkubation abgeschwommen sind mit MEF-Grundmedium, mit Ampuwa® und mit Zellkulturzusätzen zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten; Anzahl der inkubierten HF n= 330

9.2 Morphologische Veränderung der Haarfollikel während der Inkubation inkl. Negativkontrolle

Hier folgen die Abbildungen (siehe **Abbildung 53** bis **Abbildung 57**) mit den berechneten relativen Werten und Tabellen (siehe **Tabelle 26** und **Tabelle 27**) mit den gemessenen Werten der morphologischen Veränderung der HF und die daraus berechneten relativen Werte.

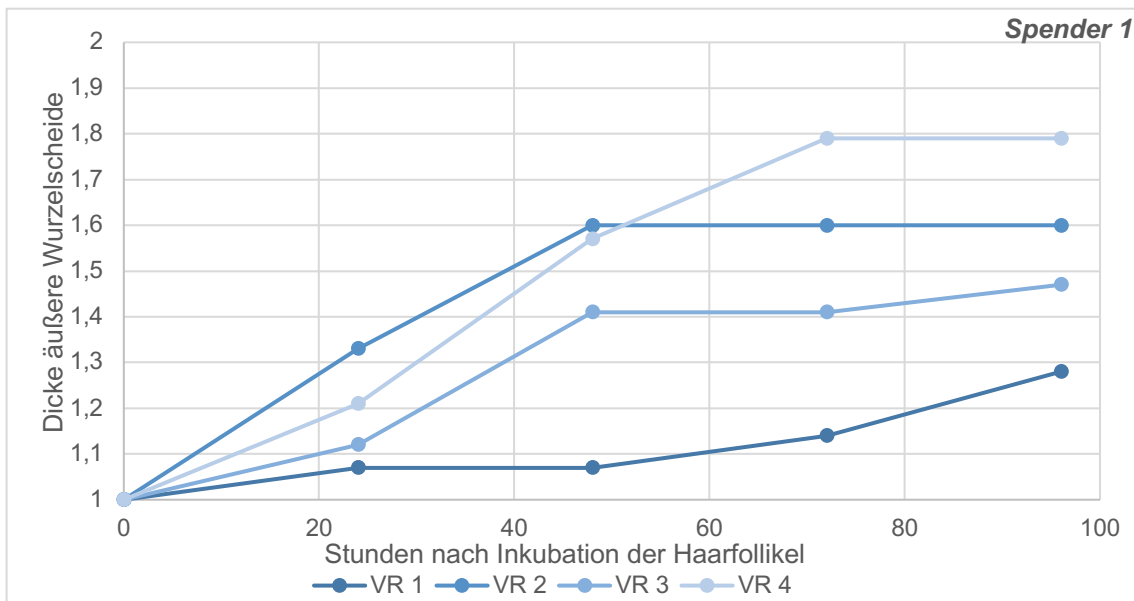


Abbildung 53: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) - Spender 1 (Anzahl der Versuchsreihen n=4)
x-Achse: Stunden nach Inkubation der HF; y-Achse: relative Werte der Dicke der äußeren Wurzelscheide; VR= Versuchsreihe

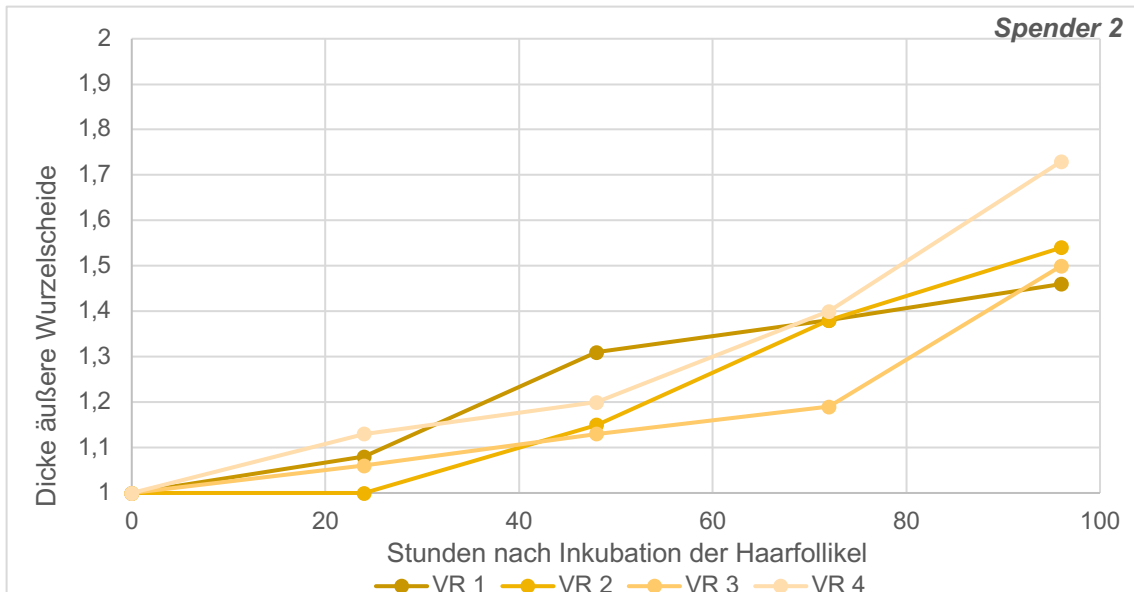


Abbildung 54: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) - Spender 2 (Anzahl der Versuchsreihen n=4)
 x-Achse: Stunden nach Inkubation der HF; y-Achse: relative Werte der Dicke der äußeren Wurzelscheide; VR= Versuchsreihe

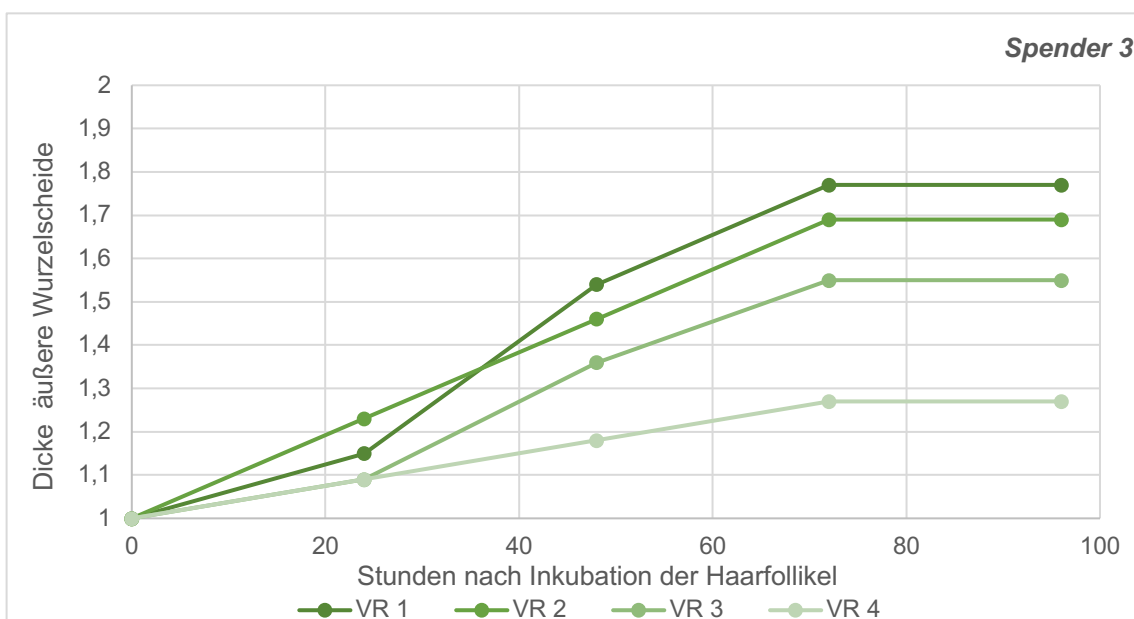


Abbildung 55: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) – Spender 3 (Anzahl der Versuchsreihen n=4)
 x-Achse: Stunden nach Inkubation der HF; y-Achse: relative Werte der Dicke der äußeren Wurzelscheide; VR= Versuchsreihe

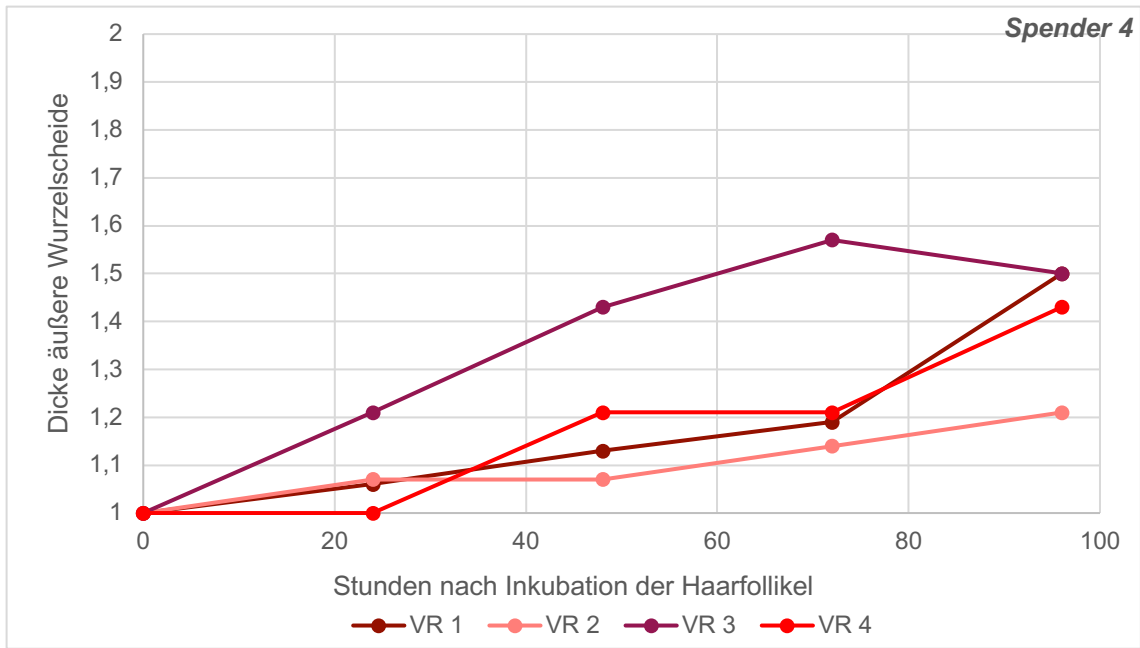


Abbildung 56: Morphologische Veränderung der vier untersuchten Haarfollikel (HF) - Spender 4 (Anzahl der Versuchsreihen n=4)
 x-Achse: Stunden nach Inkubation der HF; y-Achse: relative Werte der Dicke der äußeren Wurzelscheide; VR= Versuchsreihe

Tabelle 26: Absolute, gemessene Werte (in mm) und relative Werte der morphologischen Veränderung der HF während der Inkubation der Spender S1 und S2

Spender 1			
<i>Versuchsreihe</i>	<i>Zeitpunkt</i>	<i>Messung in mm</i>	<i>relative Werte</i>
S1-1	0 h	14	1
	24 h	15	1,07
	48 h	15	1,07
	72 h	16	1,14
	96 h	18	1,28
S1-2	0 h	15	1
	24 h	20	1,33
	48 h	24	1,6
	72 h	24	1,6
	96 h	24	1,6
S1-3	0 h	17	1
	24 h	19	1,12
	48 h	24	1,41
	72 h	24	1,41
	96 h	25	1,47
S1-4	0 h	14	1
	24 h	17	1,21
	48 h	22	1,57
	72 h	25	1,79
	96 h	25	1,79

Spender 2			
<i>Versuchsreihe</i>	<i>Zeitpunkt</i>	<i>Messung in mm</i>	<i>relative Werte</i>
S2-1	0 h	13	1
	24 h	14	1,08
	48 h	17	1,31
	72 h	18	1,38
	96 h	19	1,46
S2-2	0 h	13	1
	24 h	13	1
	48 h	15	1,15
	72 h	18	1,38
	96 h	20	1,54
S2-3	0 h	16	1
	24 h	17	1,06
	48 h	18	1,13
	72 h	19	1,19
	96 h	24	1,5
S2-4	0 h	15	1
	24 h	17	1,13
	48 h	18	1,2
	72 h	21	1,4
	96 h	26	1,73

Tabelle 27: Absolute, gemessene Werte (in mm) und relative Werte der morphologischen Veränderung der HF während der Inkubation der Spender S3 und S4

Spender 3			
Versuchsreihe	Zeitpunkt	Messung in mm	relative Werte
S3-1	0 h	13	1
	24 h	15	1,15
	48 h	20	1,54
	72 h	23	1,77
	96 h	23	1,77
S3-2	0 h	13	1
	24 h	16	1,23
	48 h	19	1,46
	72 h	22	1,69
	96 h	22	1,69
S3-3	0 h	11	1
	24 h	12	1,09
	48 h	15	1,36
	72 h	17	1,55
	96 h	17	1,55
S3-4	0 h	11	1
	24 h	12	1,09
	48 h	13	1,18
	72 h	14	1,27
	96 h	14	1,27

Spender 4			
Versuchsreihe	Zeitpunkt	Messung in mm	relative Werte
S4-1	0 h	16	1
	24 h	17	1,06
	48 h	18	1,13
	72 h	19	1,19
	96 h	24	1,5
S4-2	0 h	14	1
	24 h	15	1,07
	48 h	15	1,07
	72 h	16	1,14
	96 h	17	1,21
S4-3	0 h	14	1
	24 h	17	1,21
	48 h	20	1,43
	72 h	22	1,57
	96 h	21	1,5
S4-4	0 h	14	1
	24 h	14	1
	48 h	17	1,21
	72 h	17	1,21
	96 h	20	1,43

Zusätzlich findet sich unten stehend in Abbildung ein Diagramm, in dem die relativen Werte aller Versuchsreihen der Spender S1, S2, S3 und S4 dargestellt sind.

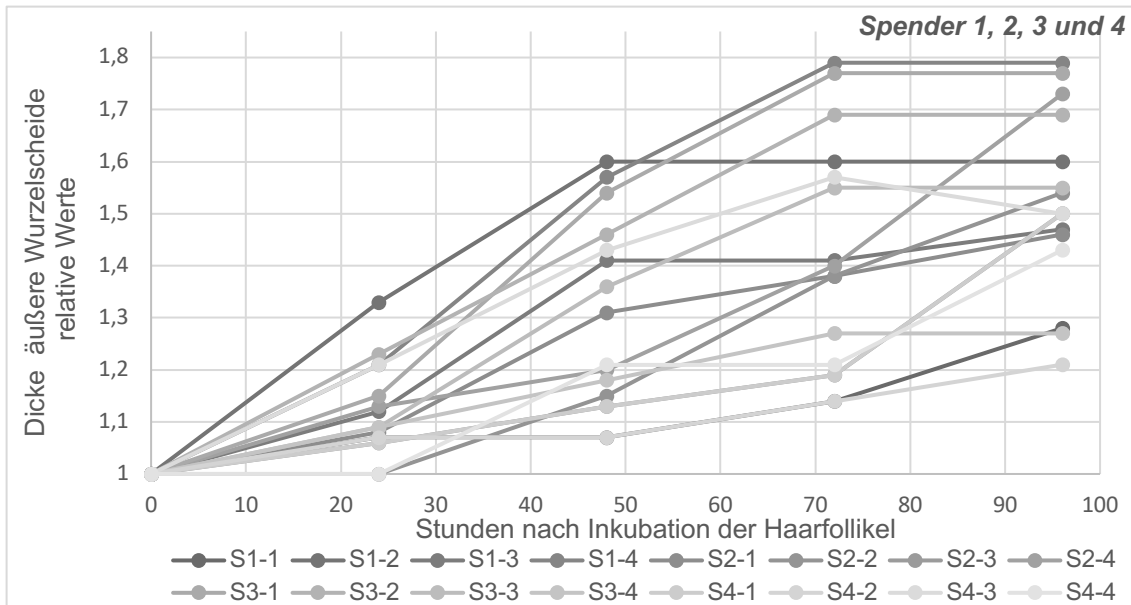


Abbildung 57: Morphologische Veränderung der HF aller Spender (Spender S1, S2, S3, S4)

x-Achse: Stunden nach Inkubation der HF; y-Achse: relative Werte der Dicke der äußeren Wurzelscheide; Anzahl der Versuchsreihen pro Spender n= 4

Für den Versuchsteil der Negativkontrolle (siehe 3.4) für die morphologische Veränderung der HF findet sich in **Tabelle 28** die Auflistung aller gemessener Werte und der berechneten relativen Werte zur Übersicht.

Tabelle 28: Absolute, gemessene Werte (in mm) und relative Werte der Negativkontrolle der morphologischen Veränderung der HF während der Inkubation mit Ampuwa® der Spender S1, S2, S3 und S4

Spender 1, 2, 3, 4			
Versuchsreihe	Zeitpunkt	Messung in mm	relative Werte
HF Kontrolle – S1	0 h	17	1
	24 h	17	1
	48 h	17	1
	72 h	15	0,88
	96 h	15	0,88
HF Kontrolle – S2	0 h	15	1
	24 h	16	1,07
	48 h	15	1
	72 h	13	0,87
	96 h	13	0,87
HF Kontrolle – S3	0 h	15	1

	24 h	15	1
	48 h	15	1
	72 h	11	0,73
	96 h	11	0,73
HF Kontrolle – S4	0 h	17	1
	24 h	19	1,12
	48 h	19	1,12
	72 h	16	0,94
	96 h	16	0,94

9.3 Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten

Hinsichtlich der Untersuchung der Zeitdauer bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten wurden folgende Diagramme erstellt, die nicht alle Verwendung innerhalb der Dissertation gefunden haben. Zur Vervollständigung sollen sie jedoch hier eingefügt werden.

Abbildung 58 zeigt die Zeit in h bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den HF aller Spender und den Gesamt-Median-Wert.

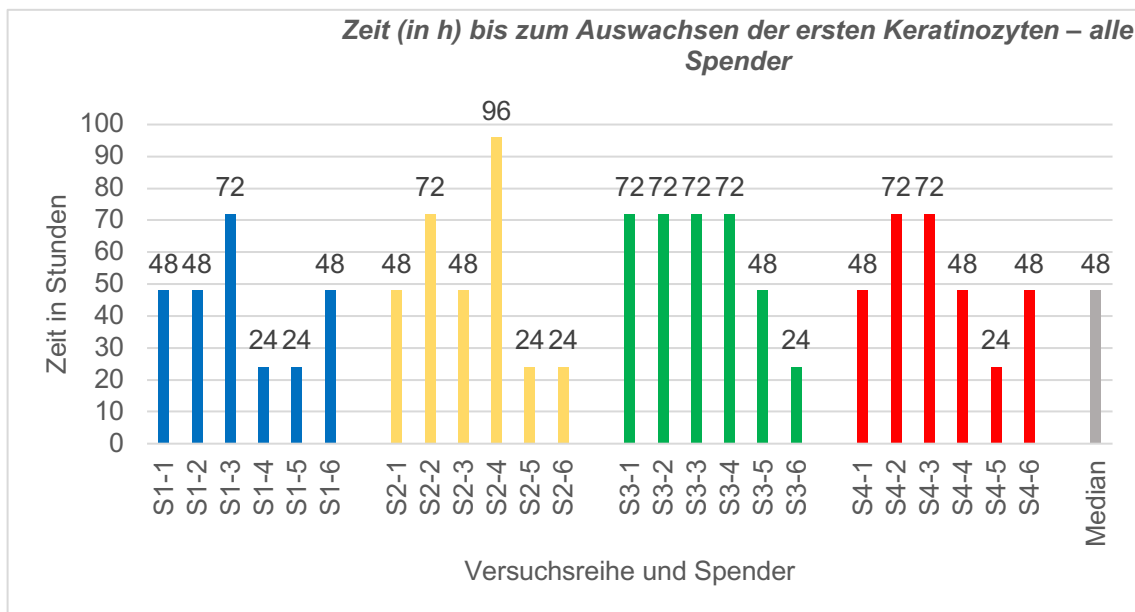


Abbildung 58: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den Haarfollikel (HF) - alle Spender (Spender S1, S2, S3, S4) inkl. Gesamt Median-Wert
 x-Achse: Versuchsreihen; y-Achse: Zeit in Stunden; Anzahl der Versuchsreihen pro Spender n= 6

Die **Abbildung 59** verdeutlicht die Zeitpunkte des Auswachsens der ersten Keratinozyten der männlichen Spender S1 und S4. **Abbildung 60** zeigt die Auswachszeitpunkt der weiblichen Spender.

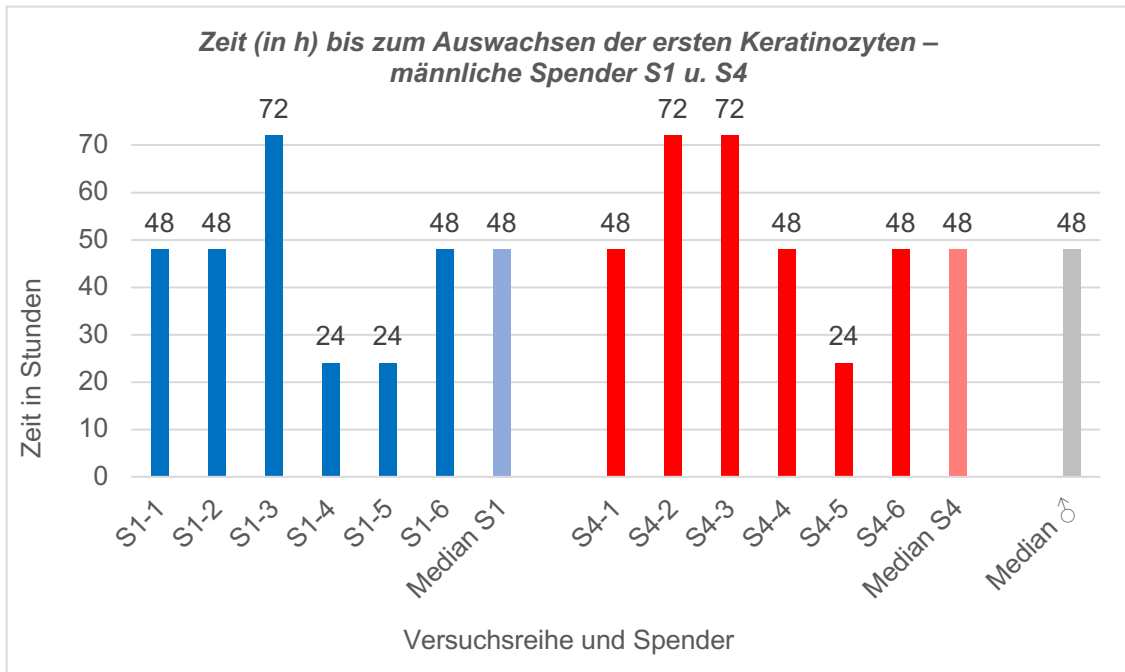


Abbildung 59: Zeit in Stunden bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Normalbedingungen - männliche Spender (S1 u. S4) inkl. Median-Wert; x-Achse: Versuchsreihen und Spender; y-Achse: Zeit in Stunden; Anzahl der Versuchsreihen pro Spender n= 6

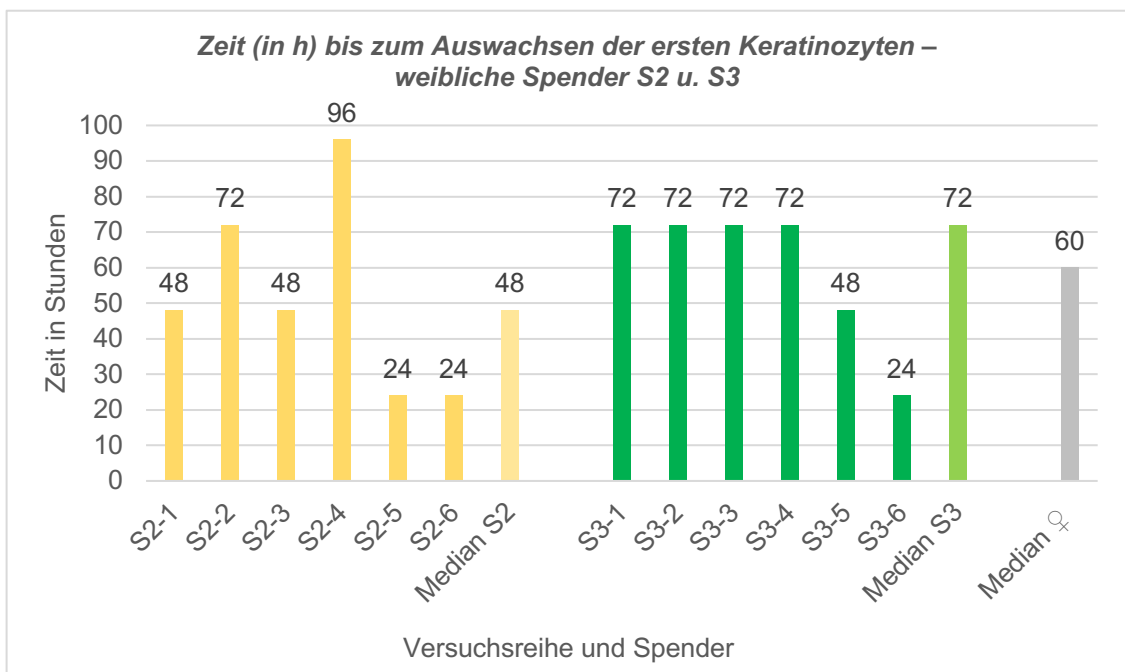


Abbildung 60: Zeit in Stunden bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Normalbedingungen - weibliche Spender (S2 u. S3) inkl. Median-Wert; x-Achse: Versuchsreihen und Spender; y-Achse: Zeit in Stunden; Anzahl der Versuchsreihen pro Spender n= 6

Zusätzlich sind in **Tabelle 29** die genauen Auswachszeitpunkte bei Kultivierung mit dem HF-Medium der ersten Keratinozyten an den HF verdeutlicht.

Tabelle 29: Zeit bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten unter Normalbedingungen - alle Spender, inkl. Medianwert

	<i>Versuch</i>	<i>Zeit in h</i>		<i>Versuch</i>	<i>Zeit in h</i>
S1	S1-1	48	S2	S2-1	48
	S1-2	48		S2-2	72
	S1-3	72		S2-3	48
	S1-4	24		S2-4	96
	S1-5	24		S2-5	24
	S1-6	48		S2-6	24
	<i>Median</i>	48		<i>Median</i>	48
S3	S3-1	72	S4	S4-1	48
	S3-2	72		S4-2	72
	S3-3	72		S4-3	72
	S3-4	72		S4-4	48
	S3-5	48		S4-5	24
	S3-6	24		S4-6	48
	<i>Median</i>	72		<i>Median</i>	48

9.4 Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten

In **Tabelle 30** sind für die Spender die jeweils neun HF aufgelistet mit dem entsprechenden Teil des Devices (1., 2. Oder 3. Teil des Device), an dem die ersten Keratinozyten ausgewachsen sind.

Tabelle 30: Ort des Auswachsens der ersten Keratinozyten an den inkubierten HF unter Normalbedingungen in Bezug auf das Device

	HF	Ort		HF	Ort		HF	Ort		HF	Ort
S1	S1-1	2.Teil	S2	S2-1	3.Teil	S3	S3-1	2.Teil	S4	S4-1	2.Teil
	S1-2	3.Teil		S2-2	2.Teil		S3-2	2.Teil		S4-2	2.Teil
	S1-3	2.Teil		S2-3	2.Teil		S3-3	2.Teil		S4-3	2.Teil
	S1-4	2.Teil		S2-4	2.Teil		S3-4	2.Teil		S4-4	2.Teil
	S1-5	3.Teil		S2-5	3.Teil		S3-5	2.Teil		S4-5	2.Teil
	S1-6	2.Teil		S2-6	3.Teil		S3-6	2.Teil		S4-6	2.Teil
	S1-7	2.Teil		S2-7	2.Teil		S3-7	1.Teil		S4-7	2.Teil
	S1-8	3.Teil		S2-8	2.Teil		S3-8	2.Teil		S4-8	2.Teil
	S1-9	2.Teil		S2-9	2.Teil		S3-9	2.Teil		S4-9	2.Teil

9.5 Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen der ersten Keratinozyten an den Haarfollikeln

In **Tabelle 31** werden die Auswachszeitpunkt der Keratinozyten an allen HF aller Spender mit den jeweiligen Zellkulturzusätzen genau aufgelistet.

Tabelle 31: Zeitpunkte, an denen erste Keratinozyten ausgewachsen sind bei Zugabe der verschiedenen Zellkulturzusätze und der MEF-Kontrollgruppe inkl. Median-Werte
Versuchsreihe – Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten

Zellkulturzusatz	Spender	HF1	HF2	HF3	HF4	HF5	HF6	Median
A83-01	S1	0	48	48	0	24	0	48
	S2	0	24	48	48	24	24	24
	S3	0	96	0	96	72	0	96
	S4	24	48	0	0	72	72	60
	<i>Gesamt-Median aller Spender</i>							
DAPT	S1	24	96	24	0	24	72	24
	S2	24	24	24	24	24	72	24
	S3	0	24	24	0	48	24	24
	S4	0	48	0	24	24	24	24
	<i>Gesamt-Median aller Spender</i>							
EGF	S1	48	0	48	96	72	72	72
	S2	0	0	0	0	48	96	72
	S3	0	0	0	0	72	48	60
	S4	24	0	48	24	24	24	24
	<i>Gesamt-Median aller Spender</i>							
IGF-1	S1	48	0	48	0	24	48	48
	S2	24	0	24	24	48	24	24
	S3	0	0	0	0	0	0	0
	S4	48	0	0	0	24	96	48
	<i>Gesamt-Median aller Spender</i>							
MEF	S1	0	0	72	0	72	96	72
	S2	48	0	72	48	0	0	48
	S3	0	0	0	0	72	0	72
	S4	48	72	48	0	0	0	48
	<i>Gesamt-Median aller Spender</i>							
SB431542	S1	0	48	48	0	72	48	48
	S2	0	48	48	24	48	24	48
	S3	0	0	0	0	0	0	0
	S4	0	0	48	0	96	24	48
	<i>Gesamt-Median aller Spender</i>							

In den folgenden Diagrammen (siehe **Abbildung 61** bis **Abbildung 64**) zeigen sich die Median-Werte der Spender S1, S2, S3 und S4 für die jeweiligen Zellkulturzusätze.

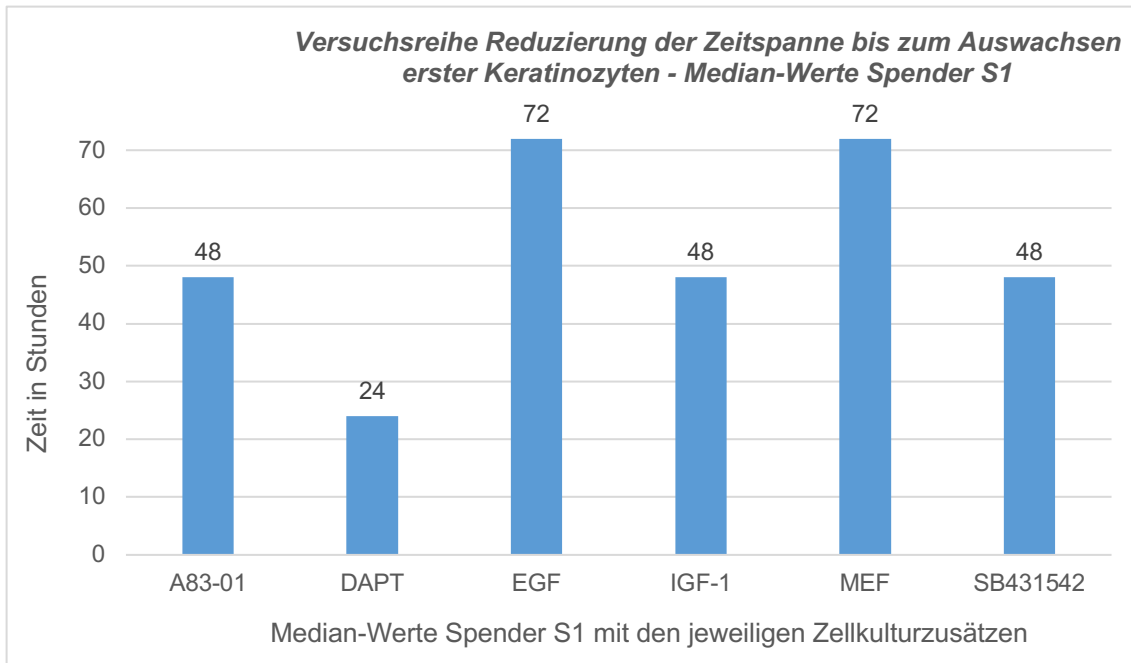


Abbildung 61: Median-Werte Spender S1 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten; y-Achse: Zeit in Stunden; Anzahl der HF n= 36

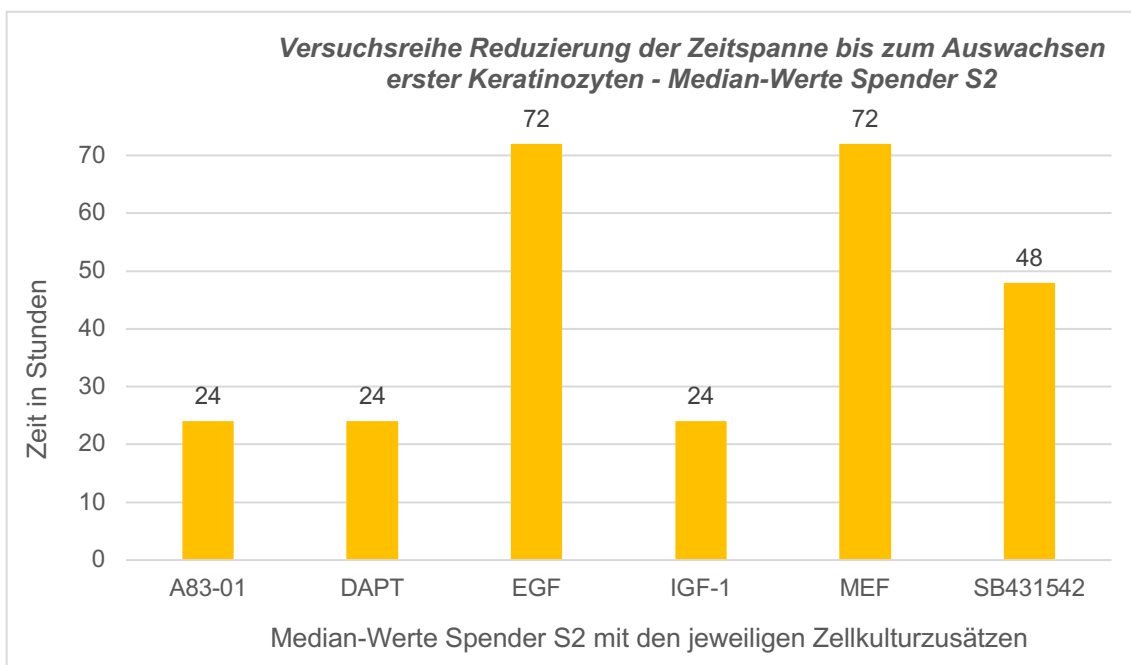


Abbildung 62: Median-Werte Spender S2 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten; y-Achse: Zeit in Stunden; Anzahl der HF n= 36

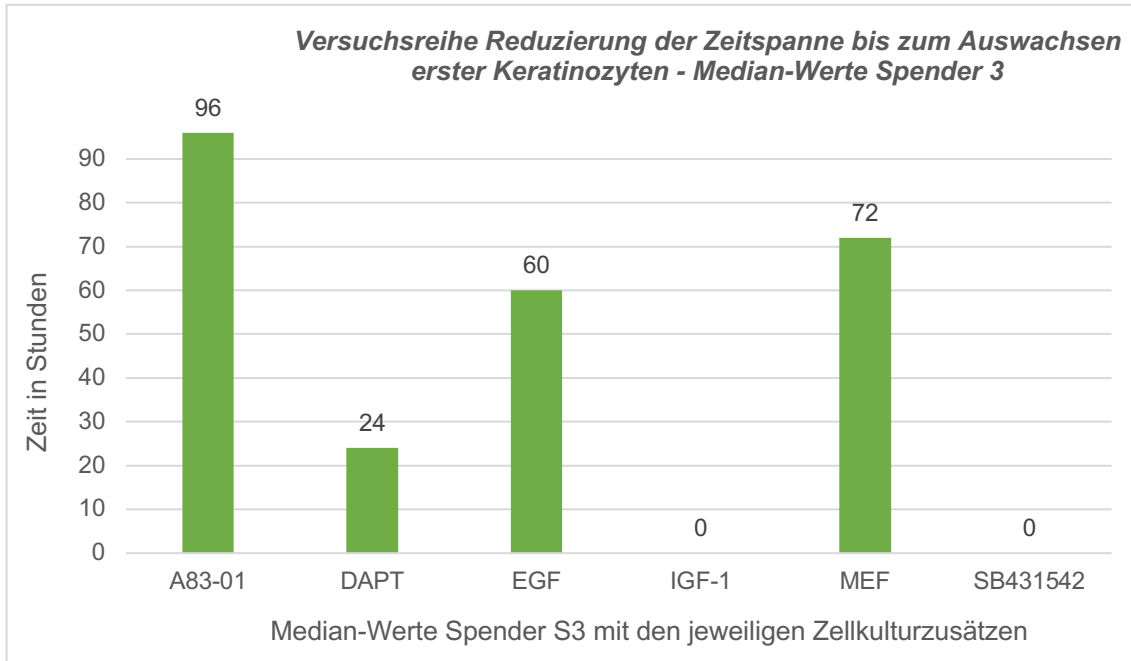


Abbildung 63: Median-Werte Spender S3 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten; y-Achse: Zeit in Stunden; Anzahl der HF n= 36

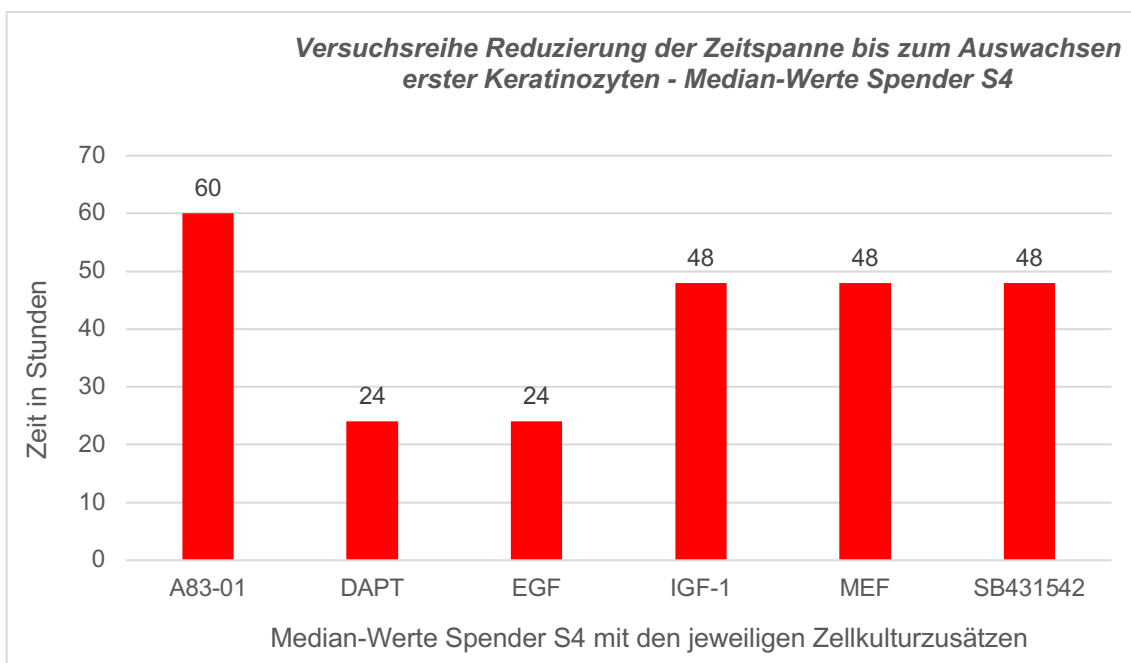


Abbildung 64: Median-Werte Spender S4 im Hinblick auf die Verwendung der verschiedenen Zellkulturzusätze zur Reduzierung der Zeitspanne bis zum Auswachsen erster Keratinozyten; y-Achse: Zeit in Stunden; Anzahl der HF n= 36