

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Potenzial der organotypischen Kultur der Haut
sowie des Hauttumors als ein in-vivo-ähnliches
Untersuchungsinstrument**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonghui Kim

aus Gangneung, Republik Korea

Datum der Promotion: 04.06.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kim, J., Guhl, S., Babina, M., Zuberbier, T., Artuc, M.; *Integration of the Human Dermal Mast Cell into the Organotypic Co-culture Skin Model*. Basophils and Mast Cells (Herausgeber: Gibbs, B. F., Falcone, F. H.), S. 69–85. Springer New York, 2014.

und

Kim, J., Artuc, M., Zuberbier, T., Förster-Ruhrmann, U., Olze, H.; *Anti-proliferative effect of histamine on squamous cell carcinoma of the skin and downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2*. In: Laryngo-Rhino-Otologie, S. 10462. Georg Thieme Verlag KG, 2018.

Inhaltverzeichnis

Vorwort	II
Inhaltverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungen	XI
Abstrakt	XIII
Abstract	XV
1 Einleitung	1
1.1 Organotypische Kultur	1
1.1.1 Organotypische Kultur der Haut	1
1.2 Struktur der Haut.....	2
1.3 Plattenepithelkarzinom.....	3
1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
1.3.2 Stadieneinteilung und Therapie des PEK	4
1.3.3 Plattenepithelkarzinom und VEGFR2	5
1.3.4 Plattenepithelkarzinom und β -Catenin	6
1.3.5 Plattenepithelkarzinom und Integrin β 4	6
1.4 Mastzelle.....	7
1.4.1 Entwicklung der Mastzelle	7
1.4.2 Physiologische Funktionen der Mastzelle.....	8
1.4.3 Aktivierung der Mastzelle.....	8
1.4.4 Histamin.....	9
1.4.5 Einflüsse der Mastzellen auf das Plattenepithelkarzinom	10
1.5 Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 und Compound 21	10
1.5.1 Angiotensin II.....	10
1.5.2 Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2	11
1.5.3 Compound 21	11
1.5.4 Rolle von AT2R	12
1.6 Fragestellung	13
2 Materialien	14
2.1 Materialien für die Zellkultur und die organotypische Kultur.....	14

2.1.1	Chemikalien und Lösungen für die Zellisolierung	14
2.1.2	Materialien für die Zellseparation der Mastzellen	14
2.1.3	Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur.....	15
2.1.4	Materialien für die organotypische Kultur.....	15
2.1.5	Medien für die Zellkultur und die organotypische Kultur	16
2.2	Materialien für die histologischen Untersuchungen.....	17
2.2.1	Materialien für die histologische Schnittherstellung	17
2.2.2	Materialien für die Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und das TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)	17
2.2.3	Antikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	18
2.3	Verbrauchsmaterialien	19
2.4	Geräte.....	20
3	3 Methode.....	21
3.1	Zellisolierung und Zellkultur	21
3.1.1	Isolierung und Kultur der Mastzellen	21
3.1.2	Isolierung und Kultur der Keratinozyten.....	23
3.1.3	Isolierung und Kultur der Fibroblasten	24
3.1.4	Kultur der SCC12- und SCC13-Zellen.....	24
3.1.5	Trypsinierung der Keratinozyten, Fibroblasten sowie SCC12- und SCC13-Zellen	25
3.1.6	Kryokonservierung der Keratinozyten, Fibroblasten sowie SCC12- und SCC13-Zellen	25
3.2	Organotypische Kultur	25
3.2.1	Dermisäquivalent ohne Mastzellen.....	26
3.2.2	Dermisäquivalent mit Mastzellen	27
3.2.3	Epithelisierung mit Keratinozyten und SCC12-/SCC13-Zellen	27
3.2.4	Air-Lifting	27
3.3	Histologische Untersuchungen	28
3.3.1	Vorbereitung der histologischen Untersuchungen	28
3.3.2	Immunhistochemische Untersuchung.....	28
3.3.3	Immunfluoreszenz	29
3.3.4	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL).....	29
3.3.5	Fotodokumentation.....	30

3.4	Untersuchung in der Monokultur	30
3.5	Statistische Analyse	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Etablierung einer organotypischen Kultur der Haut und der Hauttumoren	31
4.1.1	Organotypische Kultur der Haut und Integration der Mastzellen	31
4.1.2	Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms und Integration der Mastzellen	34
4.1.3	Wachstum der SCC12- und SCC13-Zellen in der jeweiligen Monokultur ...	37
4.1.4	Organotypische Kultur der Haut und Integration der Mastzellen und Plattenepithelkarzinomzellen	38
4.2	Einfluss der Mastzellen auf das Plattenepithelkarzinom in der organotypischen Kultur der Haut.....	40
4.2.1	Einfluss der Mastzellen auf SCC12 in der organotypischen Kultur der Haut.....	40
4.2.2	Einfluss der Mastzellen auf SCC13 in der organotypischen Kultur der Haut.....	40
4.3	Einfluss von (aktivierten) Mastzellen auf SCC-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms der Haut	41
4.3.1	Einfluss der Mastzellen auf SCC12 in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms	41
4.3.2	Einfluss von (aktivierten) Mastzellen auf SCC13-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms	43
4.4	Wirkungen von Histamin auf das Plattenepithelkarzinom der Haut in der organotypischen Kultur	45
4.4.1	Wirkungen von Histamin auf SCC12 in der organotypischen Kultur	45
4.4.2	Wirkungen von Histamin auf SCC13 in der organotypischen Kultur	49
4.4.3	Wirkungen von Histamin auf SCC12 und SCC13 in der Monokultur	52
4.5	Wirkungen von Compound 21 auf das Plattenepithelkarzinom.....	53
4.5.1	Expression von AT2R in SCC12 und SCC13	53
4.5.2	Wirkungen von Compound 21 auf SCC12 in der organotypischen Kultur ..	53
4.5.3	Wirkungen von Compound 21 auf SCC13 in der organotypischen Kultur ..	55
4.5.4	Wirkungen von C21 auf SCC12 und SCC13 in der Monokultur.....	57
4.6	Wirkungen von Compound 21 auf die Keratinozyten	58

4.6.1 Wirkungen von Compound 21 auf die Keratinozyten in der organotypischen Kultur	59
5 Diskussion	63
5.1 Etablierung einer organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms mit Mastzellen.....	63
5.2 Effekte von Histamin auf PEK-Zellen in der organotypischen Kultur – anti-proliferative Wirkung und Expressionsinhibition von VEGFR2.....	64
5.3 Antiproliferative und apoptotische Wirkung von Compound 21 auf das Plattenepithelkarzinom.....	66
5.4 Antiproliferative und apoptotische Wirkung von Compound 21 auf Keratinozyten in der organotypischen Kultur	66
5.5 Verhaltensunterschiede der Zellen in Abhängigkeit von der Kulturform.....	67
5.6 Hochregulierung von β -Catenin in SCC13 und Wachstum des Plattenepithelkarzinoms in der organotypischen Kultur	69
5.7 Potenzial der organotypischen Kultur als Ersatz anderer Methoden	70
Literaturverzeichnis	72
Eidesstattliche Versicherung	93
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	94
Lebenslauf.....	95
Publikationsliste	96
Danksagung	97

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der organotypischen Kultur.....26
- Abbildung 2:** Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen mit „FAD-Medium“ bzw. mit „KGM ohne BPE“. Färbung mit Hämatoxylin.31
- Abbildung 3:** Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen mit „FAD-Medium“ und mit „KGM ohne BPE“. Immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen Tryptase bzw. Chymase.32
- Abbildung 4:** Anzahl der Fibroblasten in den organotypischen Kulturen mit „FAD-Medium“ bzw. mit „KGM ohne BPE“.33
- Abbildung 5:** Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen mit „KGM ohne BPE“. Immunhistochemische Färbung mit Anti-BrdU, Anti-Integrin- β 4, Anti-Transglutaminase und Anti-CK10..34
- Abbildung 6:** Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Mastzellen und SCC12- bzw. SCC13-Zellen. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen BrdU bzw. Ki-6735
- Abbildung 7:** Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Mastzellen und SCC12- bzw. SCC13-Zellen. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen CK17, β -Catenin bzw. Integrin β 436
- Abbildung 8:** Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Mastzellen und SCC12- bzw. SCC13-Zellen. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Tryptase.....37
- Abbildung 9:** Anzahl der SCC12- und SCC13-Zellen in der Monokultur 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen37
- Abbildung 10:** Integration der Mastzellen und Plattenepithelkarzinomzellen (SCC12) in die organotypische Kultur der Haut. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Tryptase, Chymase bzw. GFP..38
- Abbildung 11:** Integration der Mastzellen und Plattenepithelkarzinomzellen (SCC13) in die organotypische Kultur der Haut. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen GFP, Tryptase bzw. Chymase.

	Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Integrin $\beta 4$ bzw. c-kit	39
Abbildung 12:	Anzahl der GFP-positiven SCC13-Kolonien in der organotypischen Kultur ohne bzw. mit Mastzellen	41
Abbildung 13:	Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne Mastzellen, mit Mastzellen und bei einer Mastzellenaktivierung. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen BrdU, β -Catenin bzw. Integrin $\beta 4$	42
Abbildung 14:	Anzahl der BrdU-positiven SCC12-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne Mastzellen, mit Mastzellen und mit Mastzellenaktivierung	43
Abbildung 15:	Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne Mastzellen, mit Mastzellen und mit Mastzellenaktivierung. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen BrdU, β -Catenin bzw. Integrin $\beta 4$	44
Abbildung 16:	Anzahl der BrdU-positiven SCC13-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne Mastzellen, mit Mastzellen und mit Mastzellenaktivierung	45
Abbildung 17:	Anzahl der BrdU-positiven SCC12-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Histamin	46
Abbildung 18:	Anzahl der Ki-67-positiven SCC12-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Histamin	47
Abbildung 19:	Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Histamin. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Ki-67, β -Catenin, Integrin $\beta 4$ bzw. VEGFR2.....	48
Abbildung 20:	Anzahl der BrdU-positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Histamin	49
Abbildung 21:	Anzahl der Ki-67-positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Histamin	50

- Abbildung 22:** Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Histamin. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Ki-67, β -Catenin, Integrin β 4 bzw. VEGFR2.....51
- Abbildung 23:** Anzahl der SCC12-Zellen in der Monokultur mit bzw. ohne Histamin 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen.....52
- Abbildung 24:** Anzahl der SCC13-Zellen in der Monokultur mit bzw. ohne Histamin 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen52
- Abbildung 25:** Immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen AT2R in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12 und SCC13)53
- Abbildung 26:** Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Compound 21-Gabe. Immunhistochemie mit Antikörpern gegen BrdU.....54
- Abbildung 27:** TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling Färbung in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Compound 21.....54
- Abbildung 28:** Anzahl der BrdU-positiven SCC12-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Compound 21 55
- Abbildung 29:** Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Compound 21-Gabe. Immunhistochemie mit Antikörpern gegen BrdU.....56
- Abbildung 30:** Anzahl der BrdU-positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Compound 21 56
- Abbildung 31:** TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling Färbung in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Compound 2157
- Abbildung 32:** Anzahl der TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Compound 21.....57

Abbildung 33:	Anzahl der SCC12-Zellen in der Monokultur ohne bzw. mit C21 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen.	58
Abbildung 34:	Anzahl der SCC13-Zellen in der Monokultur ohne bzw. mit C21 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen	58
Abbildung 35:	Organotypische Kultur der Haut (Epithelisierung mit Keratinozyten) mit Compound 21. Immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen CK10 bzw. Transglutaminase.	60
Abbildung 36:	Organotypische Kultur der Haut (Epithelisierung mit Keratinozyten) mit Compound 21. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling sowie immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen BrdU.	61
Abbildung 37:	Anzahl der BrdU-positiven Keratinozyten in der organotypischen Kultur der Haut (Epithelisierung mit Keratinozyten) ohne bzw. mit C21 (1×10^{-7} M bzw. 1×10^{-6} M).....	62

Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Proteinkinase B
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
AT2R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BPE	Bovine Pituitary Extract
C21	Compound 21
CD4/13/34	Cluster of Differentiation 4/13/24
CK	Cytokeratin
c-kit	Stammzelleffektor-Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
EGFR	epidermal growth factor receptor
FAD	Mischung von F12-Medium, Adenin und DMEM
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MACS	magnetic-activated cell sorting
NGS	Normal Goat Serum (normales Ziegenserum)
PBS-	phosphate-buffered saline ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
PBS+	phosphate-buffered saline mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
PEK	Plattenepithelkarzinom
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Rb	Retinoblastom-Protein
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

SCC	squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)
SCF	stem cell factor (Stammzellfaktor)
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2

Abstrakt

Einleitung: Organotypische Kulturen der Haut und des Plattenepithelkarzinoms (PEK) eröffnen neue Möglichkeiten, spezifische Fragestellungen unter in-vivo-ähnlichen Bedingungen zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Potenzial der organotypischen Kultur als Untersuchungsinstrument für die Haut und für Hauttumoren evaluiert, indem der Einfluss von Mastzellen, Histamin und des Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2-Agonisten Compound 21 (C21) auf Keratinozyten und PEK-Zellen in der organotypischen Kultur analysiert wurden.

Methode: Für die Untersuchung wurden Keratinozyten, Fibroblasten und Mastzellen aus Hautgewebe isoliert. Als PEK-Zellen wurden die Zelllinien SCC12 und SCC13 analysiert. Die organotypische Kultur bestand aus drei Komponenten: einer azellulären Schicht aus Kollagen, einem Dermisäquivalent, das Fibroblasten und Mastzellen beinhaltete, und einer epithelisierten Schicht mit Keratinozyten bzw. SCC12- oder SCC13-Zellen. 6–8 Tage nach dem Air-Lifting wurde die Kultur histologisch bearbeitet.

Ergebnisse: Die organotypischen Kulturen der Haut wurden sowohl mit Keratinozyten als auch mit PEK-Zellen mit und ohne Integration von Mastzellen erfolgreich etabliert. Dabei zeigten die Keratinozyten und PEK-Zellen in der organotypischen Kultur Wachstumsmuster, welche in der Monokultur nicht zu erkennen waren. Durch die Anwesenheit oder Aktivierung der Mastzellen ergaben sich keine Veränderungen bei den PEK-Zellen. Allerdings kam es nach Histamin-Gabe zu einer signifikant reduzierten Proliferation von SCC12- und SCC13-Zellen mit einer verminderten Expression des Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2). C21 führte in beiden Zelllinien zu einer Reduktion der Proliferation sowie zu einer Induktion der Apoptose. Diese anti-proliferativen Effekte von Histamin und C21 traten in der Monokultur nicht auf. C21 wirkte auch anti-proliferativ und pro-apoptotisch auf Keratinozyten in der organotypischen Kultur.

Diskussion: In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals, erfolgreich eine organotypische Kultur der Haut mit PEK- und Mastzellen zu etablieren. Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser organotypischen Kultur konnten repräsentativ durch die Analyse des Effekts von Mastzellen, Histamin und C21 demonstriert werden. PEK-Zellen verhielten sich in der organotypischen Kultur ‚in-vivo-ähnlicher‘ als in einer Monokultur, was die Überlegenheit der organotypischen Kultur belegt. Die proliferationshemmende

Wirkung von Histamin mit einer verminderten Expression von VEGFR2 erklärt die tumorprotektive Rolle von Mastzellen. Daher sollten VEGFR2-Antagonisten zur therapeutischen Anwendung weiterhin getestet werden. Die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung von C21 auf PEK-Zellen und Keratinozyten in der organotypischen Kultur deutet auf ein therapeutisches Potenzial dieser Substanz bei Erkrankungen wie PEK oder Psoriasis hin.

Abstract

Introduction: The organotypic culture of skin and squamous cell carcinoma (SCC) opens up a new opportunity to analyze specific questions under in vivo-like conditions. In the present work, the potential of organotypic culture as an investigational tool for the skin and cutaneous tumors was evaluated by analyzing the effects of mast cells and histamine as well as angiotensin II type 2 receptor agonist Compound 21 (C21) on keratinocytes and SCC cells in the organotypic culture.

Method: Keratinocytes, fibroblasts and mast cells were isolated from the skin tissue for investigation. Two cell lines SCC12 and SCC13 were analyzed as cells of SCC. The organotypic culture consists of three components: an acellular layer of collagen, a dermal equivalent containing fibroblasts and mast cells, and an epithelialized layer of keratinocytes and SCC12 or SCC13, respectively. In 6 to 8 days after the air-lifting, the culture was histologically processed.

Results: The organotypic cultures of the skin with keratinocytes as well as with SCC cells with and without integration of the mast cells were successfully established. The keratinocytes and SCC cells showed growth patterns in the organotypic culture, which were not detected in the monoculture. The presence or activation of the mast cells did not result in any changes in the SCC cells. However, after administration of histamine, there was a significantly reduced proliferation of SCC12 and SCC13 with an underexpression of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2). C21 led to a reduction in proliferation and an induction of apoptosis in the two cell lines. These antiproliferative effects of histamine and C21 were not demonstrated in the monoculture. C21 also had an antiproliferative and apoptotic effect on keratinocytes in the organotypic culture.

Discussion: It was possible for the first time to successfully establish an organotypic culture of the skin with SCC cells and mast cells. The diverse uses of this organotypical culture could be representatively demonstrated by analyzing the effect of mast cells, histamine and C21. SCC cells behaved more "in vivo-like" in the organotypic culture than in a monoculture, which demonstrates the superiority of the organotypic culture. The proliferation-inhibiting effect of histamine with a reduced expression of VEGFR2 explains the tumor-protective role of mast cells. Therefore, VEGFR2 antagonists should be tested for therapeutic use. The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of C21 on SCC cells

and keratinocytes in organotypic culture indicate a therapeutic potential of this substance in diseases such as SCC or psoriasis.

1 Einleitung

Trotz der Fortschritte in der Tumorforschung wurden nur noch ca. 6,7% der Tumorpharmaka, welche von 2003 bis 2011 eine dreiphasige klinische Studie durchliefen, in den USA zugelassen. Damit schnitt die Gruppe der Tumorpharmaka bei der Food and Drug Administration (FDA) Zulassung am schlechtesten ab [1]. Nahezu 40% der Kandidaten scheiterten bereits in der ersten klinischen Phase [1]. Der Grund hierfür ist, dass Tumorentwicklungen sehr komplex sind und die klassischen experimentellen Methoden, wie die Zellkultur, diese Komplexität nur ungenügend abbilden [2]. Daher sind innovative Untersuchungsmethoden erforderlich.

1.1 Organotypische Kultur

Der Begriff „organotypic“ wurde 1954 erstmalig in der biomedizinischen Wissenschaft verwendet, um die Differenzierung der Augen des Hühnerembryos zu beschreiben [3]. Unter einer organotypischen Kultur („organotypic culture“) versteht man in der Biomedizin eine Form der Zellkultur, in der sich isolierte Zellen in einer Kultur zusammen zu einer dreidimensionalen Struktur mit organähnlicher Morphologie sowie Funktion entwickeln [4]. Davon abzugrenzen ist die „Organkultur“, bei der Zellen im Gewebeverband kultiviert werden, ohne sie vorher zu isolieren [4]. Mit dem Begriff „histotypic culture“ wird eine aus einem Zelltyp bestehende dreidimensionale Kultur beschrieben [4].

1.1.1 Organotypische Kultur der Haut

Initiale Untersuchungen belegen die in-vivo-ähnlichen Differenzierung der Keratinozyten in organotypischen Kulturen der Haut. 1974 entdeckten Rheinwald und Green, wie in einer konventionellen Zellkultur ein differenziertes Wachstum der Keratinozyten erzeugt werden kann [5]. Sie kultivierten Keratinozyten und Fibroblasten zusammen in einem Medium und beobachteten die Ausbildung einer Epidermis-ähnlichen Struktur [5]. 1976 entwickelten Freeman und Kollegen eine andere Methode für ein differenziertes Wachstum der Keratinozyten, indem sie die Zellen unter Luftkontakt auf einem porcinen dermalen Gewebe kultivierten [6]. Eine der Definition entsprechende organotypische Kultur der Haut wurde 1981 zum ersten Mal durch Bell und Kollegen vorgestellt. Allerdings war dieser Versuch nicht als Langzeitkultur konzipiert, sondern für eine Hauttransplantation im Tiermodell [7]. Asselineau und Prunieras veröffentlichten 1984 die erste organotypische Langzeitkultur der Haut [8]. Diese Form der Kultur wurde daraufhin

durch verschiedene Forscher optimiert, wobei die grundlegende Konstellation mit Fibroblasten im Dermisäquivalent und Keratinozyten in der epidermalen Oberflächenschicht nicht variiert wurde. In den vergangenen Jahre wurde häufig eine 1994 durch Fusenig und Kollegen veröffentlichte Methode mit einem Dermisäquivalent aus Kollagen Typ 1 als Grundlage der organotypischen Kultur verwendet [9]. Weiter gab es Versuche, diese klassische Form der organotypischen Kultur zu optimieren. Beispielsweise wurde die Stabilität des Dermisäquivalents über ein Fibringerinnsel durch Mischung von Thrombin und Fibrinogen erhöht [10].

1.2 Struktur der Haut

Die Haut ist bei einem 70 kg schweren Erwachsenen ca. 2 m² groß und wiegt etwa 13 kg [11], womit sie das größte Organ des menschlichen Körpers darstellt. Sie schützt den Körper nicht nur als passive Barriere zur Außenwelt, sondern hat auch eine aktive Abwehrfunktion [12]. Die Haut ist in Epidermis, Dermis und Subkutis unterteilt. Die Epidermis besteht größtenteils aus Keratinozyten, aus denen sich durch Differenzierung ein mehrschichtiges verhornendes Epithel entwickelt. Die Keratinozyten sind ausschließlich im basalen Bereich proliferationsfähig [13]. An dieser Grenzzone zur Dermis bilden sie zusammen mit Fibroblasten der Dermis eine aus Extrazellulärmatrix-Bestandteilen bestehende Basalmembran [14]. Die Basalmembran ist aus drei Schichten aufgebaut: In der Mitte liegt die Lamina densa in Richtung des Epithels schließt sich die Lamina rara und in Richtung Dermis die Lamina fibroreticularis an [14]. Die Lamina densa besteht aus Kollagen Typ IV, Lamininen, Perlecan sowie Nidogenen und übt eine Barrierefunktion aus [14]. Auf der epithelialen Seite binden die Laminine an die Integrine der Keratinozyten, (z. B. Laminin-332 und Integrin $\alpha 6\beta 4$) [15] und auf der dermalen Seite an schleifenförmige Fibrillen aus Kollagen Typ VII, welche mit Fasern aus Kollagen Typ I und III im Bindegewebe der Dermis verflochten sind [16,17]. Die Keratinozyten differenzieren sich in den weiter außen liegenden Schichten (Stratum spinosum, Stratum granulosum) weiter. Die äußerste kernlose Schicht wird als Stratum corneum (Hornschicht) bezeichnet [13]. Die Wanderung der Keratinozyten vom basalen Bereich bis zur Hornschicht dauert in der normalen Haut ca. 40–56 Tage [18]. Im Zuge der dabei stattfindenden Differenzierung zeigen die Keratinozyten nicht nur morphologische Veränderungen, sondern auch eine veränderte Zusammensetzung ihres Zytoplasmas. Betroffen sind die Calcium-Konzentration [19] und das Expressionsmuster der Proteine,

was zur Beurteilung der Differenzierung genutzt werden kann. Undifferenzierte Keratinozyten exprimieren Cytokeratin (CK) 5 und 14 [20]. In differenzierten Zellen finden sich ab dem Stratum spinosum Transglutaminase, CK10 sowie Involucrin [20]. Die Proteine Loricrin und Filaggrin werden von Keratinozyten erst im Stratum granulosum exprimiert [20]. Neben den Keratinozyten sind Langerhans-Zellen sowie Melanozyten weitere Bestandteile der Epidermis. Diese Zellen haben eine Abwehrfunktion bzw. sind für die Pigmentproduktion zuständig [12,13].

Die Dermis ist ein kollagen- sowie elastinreiches Gewebe mit mikrovaskulären Blut- und Lymphgefäßen, Nerven sowie Haarwurzeln und Schweißdrüsen [21]. Daneben finden sich in ihr auch zahlreiche Immunzellen, wie Mastzellen (siehe Kapitel 1.4), Phagozyten, Lymphozyten sowie weitere antigenpräsentierende Zellen [12].

In der Subkutis, die sich aus Binde- und Fettgewebe zusammensetzt, verlaufen Blutgefäße zur Versorgung der Dermis und Epidermis [11].

1.3 Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom (PEK) der Haut ist ein maligner Tumor der Keratinozyten, der lokal destruierend wächst, aber auch metastasiert. In 90 % der Fälle manifestiert er sich im Kopf- und Gesichtsbereich [22]. Während es sich beim PEK um eine Entartung bereits differenzierter epithelialer Keratinozyten handelt [22], liegt beim Basalzellkarzinom, welches im Unterschied zum PEK kaum metastasiert, eine Entartung der mitotischen Keratinozyten vor. Eine immunhistochemische Analyse des Transmembranproteins EpCAM (epithelial cell adhesion molecule, epitheliales Zelladhäsionsmolekül) erleichtert gegebenenfalls die Differenzierung dieser beiden Tumorarten [23]. Die variablen histomorphologische Ausprägungen des PEK (z. B. Differenzierung, Infiltration, Größe, Tiefe) bieten eine Risikoeinschätzung bezüglich der Prognose [24]. Klinisch präsentiert sich das PEK als Raumforderung der Haut mit hyperkeratotischer Oberfläche oder mit einem Ulcus. Bei Verdacht auf ein PEK sollte eine histologische Untersuchung zur Sicherung der Diagnose durchgeführt werden [22]. Erforderlich sind zudem eine vollständige Inspektion der gesamten lichtbelasteten Haut und gegebenenfalls auch eine Untersuchung der regionären Lymphknotenstationen, falls ein Verdacht auf lokoregionäre Metastasen besteht oder mehrere Risikofaktoren (z. B. großer Tumordurchmesser, Infiltrationsdicke über 2 mm, Entdifferenzierung) vorliegen [22].

1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das PEK ist in Deutschland nach dem Basaliom die zweithäufigste Tumorerkrankung der Haut [25]. 2014 wurden gemäß dem Robert Koch-Institut ca. 50 000 Neuerkrankungen in Deutschland gemeldet [25]. Das mediane Erkrankungsalter liegt für Männer bei 77 Jahren und für Frauen bei 79 Jahren; die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 96 % [25]. Aus den ab 2010 in Deutschland gesammelten Daten ergab sich eine Prävalenz über alle Altersgruppen von 2,7 %, wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter anstieg [26]. Männer erkranken häufiger (3,9 %) am PEK als Frauen (1,5 %) [26]. In den USA wurde 2012 von rund 700 000 Neuerkrankungen berichtet [27]. 3,7–5,2 % der Patienten entwickelten Lymphknotenmetastasen [27]. Die Mortalität lag bei 1,5–2,1 % [27]. Zwischen den Zeiträumen 1976–1984 und 2000–2010 stieg die Häufigkeit der Erkrankung um den Faktor 2,6 an [28], was auf der Zunahme der Anzahl älterer Menschen beruht [29]. Australien hat weltweit die höchste Inzidenz. Laut einem staatlichen Bericht von 2016 betrug 2002 die altersstandardisierte Inzidenz pro 100.000 Einwohner bei Männer 499 bzw. bei Frauen 291 [30]. 2001 lag die Mortalitätsrate in Australien bei zwei von 100 000 Menschen [31]. In Finnland ist die altersstandardisierte Inzidenz pro 100.000 Einwohner mit sechs für Männer bzw. vier für Frauen deutlich geringer [32].

Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines PEK ist die langfristige Einwirkung der Ultraviolettstrahlung der Sonne [33–35]. Eine Vorgeschichte mit einem Sonnenbrand in der Kindheit scheint die Entstehung dieser Tumorerkrankung zu begünstigen [35]. Häufiger betroffen vom PEK sind zudem Bevölkerungsgruppen mit hellem Hauttyp [36], ältere Menschen [37,38] sowie immunsupprimierte Patienten und Personen mit bestimmten Erkrankungen, wie Epidermolysis bullosa dystrophica [39–41].

1.3.2 Stadieneinteilung und Therapie des PEK

Beim PEK der Haut wird für die Stadieneinteilung vornehmlich die Tumor-Nodus-Metastase-(TNM)-Klassifikationen der Union internationale contre le cancer (UICC) sowie des American Joint Committee on Cancer (AJCC) benutzt [42,43].¹ Die beiden Klassifikationen sind sich ähnlich, allerdings zieht die Einteilung des AJCC einige

¹ Eine tabellarische Darstellung der TNM-Klassifikationen ist in der „S3-Leitlinie Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut (Langversion)“ auf den Seiten 38–47 zu finden [22].

Risikofaktoren detaillierter in Betracht, wie z.B. die Lokalisation, den Differenzierungsgrad sowie die Dicke des Tumors. Eine besonders große Bedeutung hat die Infiltrationstiefe, weil sich die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung ab einer Tiefe von 2 mm erhöht [44]. Die Therapie der Wahl ist eine vollständige chirurgische Exzision im Gesunden, die bei ca. 95 % aller PEKs eine Heilung auf Dauer ermöglicht [22]. Im Falle einer Inoperabilität oder einer Non-in-sano-Resektion sollte eine Strahlentherapie durchgeführt werden [22]. Bei klinischem Verdacht auf Befall von regionären Lymphknoten sollte eine therapeutische Lymphadenektomie durchgeführt werden, sofern der Primarius operativ vollständig exzidiert werden kann [22]. Trotz der Therapie kommt es bei 3–4 % der Patienten zu einem Lokalrezidiv oder einer Metastasenbildung [22]. Bei etwa 85 % davon ist der zervikale Lymphknoten von Metastasen befallen und bei den restlichen 15 % sind Fernmetastasen nachweisbar [45–48]. Eine Chemotherapie sowie Strahlentherapie waren in einigen Studien teils erfolgreich [49,50]. Weiter gab es bereits Versuche, immunologische Therapieansätze zu entwickeln, dazu zählten spezifische Antikörper gegen den Epidermal growth factor receptor (EGFR) [51,52] oder gegen das Programmed cell death protein 1 (PD 1) [53,54]. Für eine systemische Therapie bei metastasiertem PEK ist die Datenlage bislang noch dürftig [22].

1.3.3 Plattenepithelkarzinom und VEGFR2

Der vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) ist ein Rezeptor für die vascular endothelial growth factor (VEGF) Familie, hauptsächlich für VEGF-A sowie prozessierte Formen von VEGF-C und -D. Der VEGFR2 ist einer der wichtigsten Regulatoren der Angiogenese sowie Lymphangiogenese [55]. VEGF-Rezeptoren (auch VEGFR1 und VEGFR3), welche einen extrazellulären Teil mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen besitzen, dimerisieren, nachdem sie VEGF gebunden haben [55,56]. VEGFR2 bildet sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit VEGFR1 oder VEGFR3 [55]. Zu den durch die VEGFR-Dimerisierung und Tyrosinphosphorylierung der intrazellulären Domänen ausgelösten möglichen Signalkaskaden gehört die pro-angiogene Signalkaskade über die Phospholipase C, Proteinkinase C und Mitogen-activated-protein (MAP)-Kinase [55,57].

VEGFR2 ist nicht nur in Endothelzellen vorhanden, sondern wird auch von verschiedenen Tumoren [58] wie dem PEK [59] exprimiert. Weiter produziert das PEK auch VEGF, woraus eine autokrine Wachstumsförderung der Zellen resultiert [60]. Eine Blockierung

von VEGFR2 ergab im Mausmodell eine Tumorregression [61].

1.3.4 Plattenepithelkarzinom und β -Catenin

Für β -Catenin sind bislang zwei Funktionen bekannt: Erstens ist es ein Bestandteil des Proteinkomplexes der Adhärenzverbindungen der Epithelzellen, welcher Cadherin und α -Catenin miteinander verbindet [62], zweitens reguliert es die Transkription verschiedener Zielgene [63]. Das Protein ist intrazellulär lokalisiert [63], bleibt jedoch meist an dem „destruction complex“² gebunden und wird anschließend abgebaut, sodass die zytoplasmatische β -Catenin-Konzentration in einer physiologischen Situation niedrig ist [63].

Bei Tumorerkrankungen ist dieses Gleichgewicht häufig gestört. Wnt-Liganden binden an den FZD/LRP5/6-Rezeptor.³ Anschließend wird das zytoplasmatische Dishevelled-Protein aktiviert, welches den o. g. „destruction complex“ antagonisiert [63]. Dadurch wird der β -Catenin-Abbau verhindert [63].

20–90 % der PEKs zeigten in Studien in der histopathologischen Untersuchung eine erhöhte zytoplasmatische β -Catenin-Konzentration [63]. Die Ribonukleinsäure-(RNA)-Expression des Wnt-Liganden und des FZD-Rezeptors ist beim PEK im Vergleich zur gesunden Haut erhöht [65]. Das β -Catenin-Signal scheint die Proliferation [66] sowie Invasion [67] zu verstärken. Die genauen Ursachen und Effekte der erhöhten β -Catenin-Expression sind weitgehend unklar [63].

1.3.5 Plattenepithelkarzinom und Integrin β 4

Integrin β 4 ist ein Bestandteil der Basalmembran der gesunden Haut (siehe Kapitel 1.2). Es liegt an Integrin α 6 gekoppelt. Das Dimer schafft eine Verbindung zu zytoplasmatischen Cytokeratin-Filamenten durch Interaktion mit Pectin, Kollagen Typ XVII und mit dem Bulbösen-Pemphigoid-Antigen 1 (BP230) [68]. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen wurde beobachtet, dass Integrin α 6 β 4 freigesetzt wird, indem der zytoplasmatische Anteil von Integrin β 4 phosphoryliert wird. Die Invasivität der Tumoren wird durch Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptoren, wie ErbB-1, -2, -3, c-Met,

² Ein „destruction complex“ besteht aus Axin, APC (Adenomatous-polyposis-coli-Protein), GSK-3 (Glykogensynthase-Kinase 3), CK1 (Caseinkinase 1), PP2A (Proteinphosphatase 2) und β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein) [64].

³ FZD/LRP5/6-Rezeptor ist der Rezeptor für Wnt-Liganden. FZD steht für „Frizzled“ und LRP für „lipoprotein receptor-related protein“.

Recepteur d'origine Nantais (RON), Lysophosphatidic acid receptor (LPA) 1- und -2, sowie durch Veränderungen der Genexpression, z.B. von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt) und Mitogen-activated protein kinase (MAPK) gefördert [68].

Dieses Phänomen ist auch beim PEK festzustellen. Eine Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils von Integrin $\beta 4$ erfolgt durch Aktivierung des Epidermal-growth-factor-(EGF)-Signalwegs und dessen Hemmung reduziert die Freisetzung von Integrin $\alpha 6\beta 4$ sowie die Tumormigration [69]. Ein Virus-vermittelter RNA-Interferenz-(RNAi)-Knock-out von Kollagen Typ XVII und Integrin $\beta 4$ reduzierte ebenfalls die Migration [70].

1.4 Mastzelle

1863 beschrieb Recklinghausen einen bis dahin noch unbekanntem Zelltyp in ungefärbten Schnitten des Mesenteriums von Fröschen [71]. Durch Anfärbung der Granula mit basischen Farbstoffen konnte Paul Ehrlich diese Zellen 1877 in seiner Doktorarbeit genauer charakterisieren [72,73]. Er nannte diese Zellen „Mastzellen“, in der fälschlichen Annahme, dass sie große Mengen an Substanzen aufgenommen hätten [73,74].

1.4.1 Entwicklung der Mastzelle

Mastzellen finden sich in der Haut und der Schleimhaut sowie in allen vaskularisierten Geweben außer im Zentralnervensystem und in der Netzhaut [75,76]. Eine Mastzelle besitzt intrazellulär rund 50–200 Granula, welche Inflammationsmediatoren beinhalten, wie Histamin, Chymase und Tryptase [75]. Mastzellen stammen von hämatopoetischen Cluster of differentiation (CD)34⁺-, c-kit⁺- und CD13⁺-Vorläufern des Knochenmarks ab [77]. Unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, wie Stem cell factor (SCF) und Interleukin-(IL)-3, differenzieren diese Vorläuferzellen und exprimieren mastzelltypische Zytokine [78–80]. Im Gegensatz zu anderen Leukozyten findet eine Ausdifferenzierung der Mastzellen erst nach der Einwanderung ins Gewebe statt [81,82], wobei jede Mastzelle in Abhängigkeit von der lokalen Mikroumgebung des Zielortes einen bestimmten Phänotyp annimmt [83–86]. Klassischerweise lassen sich bei humanen Mastzellen zwei Subtypen unterscheiden: MC_T (Mastzellen mit Tryptase) und MC_{TC}

(Mastzellen mit Tryptase und Chymase) [87]. In der Haut sind vorwiegend MC_{TC} zu finden (99 %) [87]. Die Verteilung der beiden Subtypen ist je nach Körperregion unterschiedlich.⁴

1.4.2 Physiologische Funktionen der Mastzelle

Mastzelle spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase in Organen, die ständig wachsen und sich regenerieren [86,88], wie die Haut, die Haarfollikel und die Knochen [89–91]. Zudem sind die Mastzellen bei der Wundheilung unverzichtbar [92,93]. In der akuten Phase der Wundheilung verstärken sie durch Ausschüttung zahlreicher Mediatoren die lokale Immunreaktion sowie Leukozyten-Rekrutierung [94–97]. Gleichzeitig führen einige Mediatoren, wie VEGF und Histamin, zu einer erhöhten Permeabilität des Gefäßendothels [98,99]. Nach dieser akuten Phase unterstützen Wachstumsfaktoren der Mastzellen (z.B. EGF, fibroblast growth factor-(FGF)-2, keratinocyte growth factor (KGF), nerve growth factor (NGF)) die Regenerierung von Keratinozyten sowie Fibroblasten [99–107]. Darüber hinaus besitzen Mastzellen auch eine Abwehrfunktion gegen Parasiten [108–111], Bakterien [112–114] und Viren [115–117].

1.4.3 Aktivierung der Mastzelle

Der meistuntersuchte Signalweg der Mastzellen ist die high-affinity Immunglobulin (Ig) E receptor (FcεRI) vermittelte Aktivierung, mit der die allergische Reaktion Typ I erklärt werden kann [118]. An der Oberfläche der Mastzellen finden sich zahlreiche FcεRI-Moleküle. Der FcεRI besteht aus einer α-Kette, an der IgE binden kann, einer β-Kette, welche sich über die Membran erstreckt, und zwei γ-Ketten, welche intrazellulär über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [119]. Der FcεRI hat eine hohe Affinität für IgE, welches von B-Lymphozyten als Reaktion auf CD4-positive T-Zellen produziert wird und in der Regel bereits ohne Antigen an diesen Rezeptor gebunden vorliegt [120]. Bei einer Vernetzung von zwei oder mehreren FcεRI-Molekülen über Antigen-IgE-Komplexe kommt es zu einer Aktivierung der Mastzellen [121], die von der Tyrosinkinase Lyn abhängig ist. Lyn führt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase Syk, wodurch es zu einer Phosphorylierung von Adaptorproteinen, wie linker for activation of T cells (LAT) und non-T cell activation linker (nTAL), kommt, welche den Ausgangspunkt für die Aktivierung

⁴ Der Anteil der MC_{TC} in der Submukosa des Dünndarms beträgt 77 % und in der Tonsille 60 %. In der Mukosa des Dünndarms (81 %) und in den Alveolen (93 %) finden sich hauptsächlich die MC_T [87].

zahlreicher weiterer Signalmoleküle darstellen [75]. Die linker for activation of T cells- (LAT)-abhängige Aktivierung induziert beispielsweise eine Inositoltriphosphat-(IP₃)-Signaltransduktion und somit eine Aktivierung der Proteinkinase C sowie eine Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, welche wiederum durch Aktivierung von nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells (NF-κB) die Transkription der Zytokine fördert [122,123]. Bei einer Aktivierung des non-T cell activation linker (nTAL) kommt es zu einer weiteren Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs, wobei die PI3K auch die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht [75,124]. Diese Kaskadenreaktionen führen in den Mastzellen letztendlich zu einer Degranulation, Lipidmediatorproduktion und Zytokin-Synthese [75].

Neben der FcεRI-vermittelten Aktivierung existieren weitere Möglichkeiten zur Mastzellenaktivierung. So sind Mastzellen beispielsweise in der Lage, Pathogene über Pattern-Recognition-Rezeptoren (z. B. Toll-like-Rezeptoren) zu erkennen und darauf zu reagieren [75]. Zudem exprimiert die Mastzelle verschiedene Rezeptoren, beispielsweise IgG-Rezeptoren, den SCF-Rezeptor (c-kit) sowie Rezeptoren für Komponenten des Komplementsystems [75]. Über diese Rezeptoren vermittelte Signale führen zur selektiven Freisetzung und Produktion von Mastzellenmediatoren [75].

1.4.4 Histamin

Histamin ist ein Hauptmediator der Mastzellen [120], welcher in deren Granula gespeichert ist und bei einer IgE- und nicht IgE-basierten Stimulation durch eine Exozytose freigesetzt wird [125]. Die Wirkungen von Histamin werden über vier Rezeptoren (H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Rezeptor) vermittelt, welche in verschiedenen Zelltypen vorkommen. Die bekanntesten Histamin-Wirkungen sind die Regulation der vaskulären Permeabilität sowie die Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur im respiratorischen Trakt über den H₁-Rezeptor [126]. Zudem werden auch die meisten Hautreaktionen, wie Erytheme, Juckreiz oder Ödeme, durch die Aktivierung des H₁-Rezeptors hervorgerufen [127]. Bei einer Aktivierung des H₂-Rezeptors kommt es zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und einer erhöhten Magensäureproduktion [127]. Der H₃-Rezeptor wird besonders in Neuronen exprimiert und scheint bei neuropathischen Schmerzen, bei der Kognition sowie beim Schlaf- und Essverhalten eine Rolle zu spielen [128–131]. Der H₄-Rezeptor vermittelt chemotaktische Signale und soll bei allergischen Reaktionen für die Erhöhung der Anzahl von Mastzellen sowie

eosinophilen Granulozyten im betroffenen Gewebe verantwortlich sein [132,133]. Zudem scheint er bei der T-Helfer-(Th)-2-Antwort eine essenzielle Rolle zu spielen [134].

1.4.5 Einflüsse der Mastzellen auf das Plattenepithelkarzinom

Der Entdecker der Mastzellen, Paul Ehrlich, beschrieb in seiner Doktorarbeit eine erhöhte Anzahl von Mastzellen im Tumorgewebe. Mikhail und Miller-Milinska stellten 1964 beim PEK der Haut ebenfalls eine erhöhte Anzahl von Mastzellen fest [135]. Zum selben Ergebnis kam 1986 die Arbeitsgruppe von Claudatus nach einer histopathologischen Untersuchung von Hauttumoren, vor allem des PEK [136]. Auch experimentell wurde dieses Phänomen beobachtet: Bei einer Inokulation einer PEK-Zelllinie in Mäuse wurde nach 40 Tagen eine erhöhte Anzahl von Mastzellen im Tumorbereich nachgewiesen [137].

Die Einflüsse von Mastzellen auf das PEK der Haut wurden bislang kaum untersucht⁵. Das PEK exprimiert H1- und H2-Rezeptoren [138]. Mastzellen induzieren im PEK die IL-6- und IL-8-Synthese, welche Immunreaktionen auslösen [139]. Eine andere Studie zeigt, dass Histamin die Interferon-gamma induced protein 10 KD (IP-10) Synthese über den H2-Rezeptor reduziert. Die daraus folgende Abschwächung der Immunantwort begünstigt die Tumorprogression des PEK [138]. Jüngere Studien ergaben unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Histamin-vermittelte Proliferationsinduktion im PEK [140,141].

1.5 Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 und Compound 21

1.5.1 Angiotensin II

Angiotensin II (Ang II) ist ein Produkt des Renin-Angiotensin-Systems. Das aus 452 Aminosäuren bestehende Vorläuferprotein Angiotensinogen wird im Wesentlichen in der Leber produziert [142] und im juxtaglomerulären Apparat der Niere durch Renin zum Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) gespalten [142]. Das Prohormon Ang I wird mit Hilfe des endothelständigen Angiotensin-konvertierenden Enzyms weiter zum Oktapeptid Ang II umgesetzt [142–144].

⁵ Auf PubMed gibt es insgesamt 39 Treffer bei der Schlagwortsuche nach „mast cells“ AND „skin“ AND „squamous cell carcinoma“ (abgerufen am: 15.06.2020).

1.5.2 Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2

1989 wurde erstmals nachgewiesen, dass es mehr als einen Rezeptor für Ang II gibt [145–147]. Die beiden zuerst identifizierten Angiotensin-II-Rezeptoren wurden AT1R und AT2R genannt [148,149]. Laut derzeitigem Forschungsstand werden die meisten bekannten Wirkungen von Ang II, wie die Blutdruckregulation, über den AT1R vermittelt.

Der AT2R ist ein aus 363 Aminosäuren bestehender 7-Transmembranhelix-Rezeptor [150], der in der Genregion Xq22-q23 codiert wird [151]. Die molekulare Masse des Rezeptors variiert zwischen 68 und 113 kDa, da er fünf potenzielle N-Glykosylierungsstellen besitzt [152]. Die Aminosäuresequenz von AT2R weist in der Transmembrandomäne eine 24–36%ige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von AT1R auf [153]. Die wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Rezeptoren finden sich in der dritten intrazellulären Schleife und am Carboxy-Terminus [154]. Der AT2R zeigt eine ähnliche Affinität zu Ang II ($K_D = 4,6 \pm 1,3$ nM) wie der AT1R ($K_D = 4,7 \pm 1,8$ nM) [153].

Die Signalkaskade über AT2R ist bisher nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird eine Beteiligung des AT2R-Bindungsproteins [155,156], der Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP 1) [157] und des Transkriptionsfaktors Promyelotic leukaemia zing finger protein (PLZF) [158,159]. Obwohl der AT2R zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört [160], zeigt er keine klassischen Eigenschaften dieser Familie, wie Phosphorylierung und Desensibilisierung [154].

1.5.3 Compound 21

Compound 21 (C21) ist der erste selektive AT2R-Agonist, der kein Peptid ist [161]. C21 wurde durch eine Modifikation des nicht selektiven Agonisten von Ang II, L-162,313 (1), hergestellt [161]. C21 ist ein hochspezifischer AT2R-Agonist, mit einer K_i von 0,4 nM für AT2R und von über 1000 nM für AT1R [161]. Im Rattenmodell ergaben sich eine Bioverfügbarkeit von ca. 20–30 % nach oraler Applikation und eine Halbwertszeit von 4 h [161].

C21 erlaubt erstmals eine selektive Stimulation des AT2R. Der bis dahin eingesetzte Agonist CGP42112 zeigt bei einer hohen Konzentration eine unspezifische agonistische Wirkung auf AT1R ($K_i = 1,7$ μ M) [162,163]. Zudem ist dieses Molekül metabolisch instabil, sodass eine orale Applikation ungünstig ist [145–147]. Zur indirekten Analyse der Rolle

des AT2R nutzten daher Studien früher eine AT2R-Deletion im Mausmodell oder den selektiven AT2R-Antagonisten PD123319.

1.5.4 Rolle von AT2R

Die Funktionen von AT2R wurden in den vergangenen Jahren auf vielfältige Weise untersucht, konnten jedoch nicht vollständig geklärt werden. Insbesondere gibt es bisher kaum Untersuchungen mit Hauttumoren.

Im embryonalen Gewebe überwiegt die Expression von AT2R gegenüber der von AT1R [164,165]. Im Laufe der weiteren Entwicklung kehrt sich das Verhältnis der beiden Rezeptoren um, sodass sich AT2R im adulten Gewebe nur noch in geringem Maße findet [154,164,165]. In einer pathologischen Situation mit einer Gewebeschädigung und einem Re-Modeling, wie bei Hautverletzungen [166], Myokardinfarkt [167,168], zerebraler Ischämie [169], chronischer Niereninsuffizienz [170], Gefäßverletzungen [171], Atherosklerose [172,173] und rheumatoider Arthritis [174], wird die Expression von AT2R jedoch erhöht.

In Experimenten mit AT2R-deletierten Mäusen war keine klar ersichtliche Entwicklungsstörung festzustellen [175], allerdings traten eine erhöhte Inzidenz von renalen und urologischen Fehlbildungen, eine verzögerte Vaskulogenese, ein erhöhter Blutdruck, eine erniedrigte Körpertemperatur sowie ein abgeschwächtes Explorationsverhalten auf [175–178]. Bei den Mäusen mit verstärkter AT2R-Expression gab es Hinweise auf eine gegenteilige Wirkung von AT2R im Vergleich zu AT1R, nämlich eine Reduzierung des Blutdrucks durch eine Vasodilatation und einen negativen chronotropen Effekt [179,180].

Mit der Entwicklung von C21 wurde eine Untersuchung von AT2R durch eine selektive Stimulation dieses Rezeptors möglich (siehe Kapitel 1.5.3). Neuere Studien erbrachten vielversprechende Erkenntnisse, besonders in Bezug auf kardiale, nephrologische und neurologische Erkrankungen. Im Rattenmodell führte eine Gabe von C21 postinfarktiell zu einer ventrikulären Funktionsverbesserung, einer Größenreduktion der kardialen Läsion sowie zu einer verminderten Expression der Entzündungs- bzw. Apoptosemarker in der Perinfarktzone [181]. Ebenfalls soll eine AT2R-Aktivierung durch C21 bei einem Herzversagen bzw. einer Hypertonie kardiovaskulär protektiv wirken [182,183]. Zudem wurden bei einer systemischen Hypertonie nach Stimulation mit C21 nephroprotektive Wirkungen durch Reduktion der inflammatorischen Zellinfiltration sowie der

Inflammationsfaktoren gezeigt [184,185]. Darüber hinaus zeigte eine Behandlung mit C21 in einem simulierten Schlaganfall eine protektive Wirkung durch Reduktion der Infarktgröße und Regression des motorischen Defizits [186]. In vitro war nach einer Behandlung mit C21 eine Aktivierung der Mikroglia zu beobachten [187]. Bezüglich der Hauttumoren gibt es bisher keine Untersuchung mit C21.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potenzial der organotypischen Kultur als ein in-vivo-ähnliches Untersuchungsinstrument für die Haut und Hauttumoren evaluiert. Dazu wurde eine organotypische Kultur der Haut sowie des PEK mit Mastzellen etabliert (1). In dieser Kultur wurden die Einflüsse von Mastzellen/Histamin auf PEK-Zellen (2) sowie die Einflüsse von C21 auf PEK-Zellen und Keratinozyten (3) untersucht. Diese Einflüsse wurden auch in der Monokultur analysiert und die Ergebnisse mit denen der organotypischen Kultur verglichen (4).

2 Materialien

2.1 Materialien für die Zellkultur und die organotypische Kultur

2.1.1 Chemikalien und Lösungen für die Zellisolierung

- Amphotericin B (250 µg/ml), PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland.
- Collagenase type IV, Worthington Biochem, Freehold, USA.
- Dispersionsmedium: 5 ml Penicillin/Streptomycin, 10 ml Fetal calf serum (FCS), 1,25 mg Amphotericin B und 2,5 ml MgSO₄ wurden mit 500 ml Phosphate-buffered saline mit Ca²⁺/Mg²⁺ (PBS+) gemischt. 10–15 mg Collagenase type IV, 5–7,5 mg Hyaluronidase type 1S und DNase 1 (Endkonzentration im Dispersionsmedium: 10 µg/ml) wurden in 10 ml der zuvor hergestellten Lösung verdünnt.
- Dispase type 1, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland. Dispase type 1 wurde in PBS+ aufgelöst (Endkonzentration: 3 U/ml).
- DNase 1, Roche Applied Science, Berlin, Deutschland.
- FCS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland. Eine Inaktivierung der komplementären Proteine erfolgte durch eine Inkubation bei 56 °C für 30 min vor der Anwendung.
- Hyaluronidase type 1S, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- MgSO₄, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Penicillin/Streptomycin (10 000 IU/ml und 10 000 µg/ml), Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, Deutschland.
- PBS+, PAA Laboratories, Pasching, Österreich.
- Phosphate-buffered saline ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (PBS-) PAA Laboratories, Pasching, Österreich.
- Soybean trypsin inhibitor (SBTI), Merck, Darmstadt, Deutschland.
- 0,05 % Trypsin / 0,01 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, Deutschland.

2.1.2 Materialien für die Zellseparation der Mastzellen

- Anti-human CD117 MicroBead Kit, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland.
- EDTA (100 mM), B. Braun, Melsungen, Deutschland.
- Human AB Serum, Invitrogen, Carlsbad, USA.

- magnetic-activated cell sorting-(MACS)-Puffer: 500 ml PBS- mit 50 ml FCS und 10 ml EDTA.
- Pre-Separation Filter (30 µm), Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland.
- Sandoglobulin® (30 000 µg/ml), CSL Behring, King of Prussia, USA.
- Siebe (Maschenweite: 300 µm), pluriSelect, Leipzig, Deutschland.
- Siebe (Maschenweite: 40 und 100 µm), VWR, Darmstadt, Deutschland.

2.1.3 Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur

- Adenin, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Ascorbinsäure, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Cryo 1°C Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland.
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- EGF, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Hydrocortison, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Insulin, human recombinant, Biomol, Hamburg, Deutschland.
- IL-4, PeproTech, Hamburg, Deutschland. IL-4 wurde in PBS- aufgelöst (20 µg/ml) und bei -80 °C aufbewahrt.
- Serum-free Freezing Medium, PromoCell, Heidelberg, Deutschland.
- SCF (50 µg/ml), PeproTech, Hamburg, Deutschland.

2.1.4 Materialien für die organotypische Kultur

- 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- CaCl₂, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
- Kollagen Typ I aus der Ratte (3,6 mg/ml), First Link Ltd., Birmingham, England.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (mit 1,0 g/l D-Glukose und L-Glutamin) (DMEM), Biochrom AG, Berlin, Deutschland.
- DMEM, 10-fach konzentriert (1,0 g/l Glukose, ohne L-Glutamin, NaHCO₃ und Folsäure) (10× DMEM), Biochrom AG, Berlin, Deutschland.
- DMEM/F-12 (1 : 1), Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, Deutschland.
- Iscove's Basal Medium mit stabilem Glutamin, Biochrom AG, Berlin, Deutschland.
- KGM-Gold™, Lonza, Köln, Deutschland.

- KGM-Gold SingleQuots, Lonza, Köln, Deutschland.
- Matrigel™ Matrix, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland.
- Metallnetzgitter, spezialgefertigt. 20 × 20 × 5 mm (Länge × Breite × Höhe).
- NaOH, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
- Nicht-essenzielle Aminosäuren, PAA Laboratories, Pasching, Österreich.
- Nylonnetz (Maschenweite: 30 µm): Das Nylonnetz wurde 20 × 20 mm groß geschnitten und in Ethanol (100 %) gewaschen und desinfiziert. Nach Trocknen wurde es in einer Lösung mit Kollagen Typ I (1,1 ml Kollagen Typ I in 50 ml 0,03 N Essigsäure) für ca. 30 min bei Raumtemperatur und danach in 25 ml Glutaraldehyd (0,1 %) für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde es mit PBS- viermal gewaschen und in 70%igem Ethanol bis zur Anwendung aufbewahrt. Vor der Anwendung wurde es mit PBS- nochmals viermal gewaschen.

2.1.5 Medien für die Zellkultur und die organotypische Kultur

- FAD-Medium: 500 ml DMEM mit F 12 (v/v 3 : 1) mit 5 ml Penicillin/Streptomycin, 50 ml FCS, Adenin (Endkonzentration: 0,089 mM), EGF (Endkonzentration: 10 ng/ml), Insulin (Endkonzentration: 5 µg/ml) und Hydrocortison (Endkonzentration: 500 ng/ml). Kurz vor der Anwendung wurden Ascorbinsäure (Endkonzentration: 50 µg/ml) und SCF (Endkonzentration: 2,5 ng/ml) zugegeben.
- Fibroblasten-Medium: 500 ml DMEM mit 5 ml Penicillin/Streptomycin und 25 ml FCS.
- Keratinozyten-Medium: KGM-Gold™ mit KGM-Gold SingleQuots.
- Mastzellen-Medium: 500 ml Iscove's Basal Medium mit 5 ml nicht-essenziellen Aminosäuren, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml FCS. Kurz vor der Anwendung wurden SCF (Endkonzentration; 100 ng/ml) und IL-4 (Endkonzentration: 20 ng/ml) zugegeben.
- KGM ohne Bovine Pituitary Extract (BPE): 500 ml Keratinozyten-Medium ohne BPE, mit CaCl₂ (Endkonzentration: 1,5 mM) und bovines Serumalbumin (BSA) (Endkonzentration: 0,1 %). Kurz vor der Anwendung wurden Ascorbinsäure (Endkonzentration: 50 µg/ml) und SCF (Endkonzentration: 2,5 ng/ml) zugegeben.
- Serum-free Freezing Medium, PromoCell, Heidelberg, Deutschland.

2.2 Materialien für die histologischen Untersuchungen

2.2.1 Materialien für die histologische Schnittherstellung

- Adhäsions-Objektträger, SuperFrost plus, Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland.
- Container für flüssigen Stickstoff, Messer Griesheim, Bad Soden, Deutschland.
- Cryomold 4557, Sakura, Tokio, Japan.
- Cryotome FSE Kryostat, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland.
- Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T.™, Sakura, Tokio, Japan.
- Flüssiger Stickstoff.

2.2.2 Materialien für die Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und das TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

- 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC+) High Sensitivity Substrate Chromogen, Ready-to-Use, Dako, Hamburg, Deutschland.
- Avidin/Biotin Kit, Vector Laboratories, Peterborough, England. Das Kit beinhaltet eine Avidin-D-Lösung und eine Biotinlösung.
- ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit, Merck, Darmstadt, Deutschland. Das Kit beinhaltet die folgenden Lösungen: Equilibration Buffer, Reaction Buffer, terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) Enzym, Stop/Wash Buffer, Blocking Solution, Anti-Digoxigenin-Fluorescein.
- Hämalaulösung sauer nach Mayer, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
- HCl (6,0 N), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
- Labeled streptavidin-biotin (LSAB2) System horseradish peroxidase (HRP), Dako North America Inc., Carpinteria, USA. Das Kit beinhaltet zwei Lösungen: einen Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper und Streptavidin-HRP.
- Mounting Medium für Hämalaulösung und Immunhistochemie: Neo-Mount, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Mounting Medium für Immunfluoreszenz: Immunoselect Antifading Mounting Medium 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Dianova, Hamburg, Deutschland.
- PAP-Pen, SCI, München, Deutschland.
- Peroxidase-Blocking-Reagenz, Dako, Hamburg, Deutschland.
- RPMI 1640, Biochrom AG, Berlin, Deutschland.

- Sekundärantikörper Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA. Verdünnung von 1 : 600 in Tris-buffered-saline (TBS) mit 2 % normal-goat serum (NGS) vor der Anwendung.
- Tris-base, Sigma-Aldrich, München, Deutschland.
- Tris-HCl, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
- Tris-Puffer (10x): 9 g Tris-base, 68,5 g Tris-HCl und 87,5 g NaCl wurden in 1 Liter destilliertem Wasser aufgelöst und vor der Anwendung zehnfach mit destilliertem Wasser verdünnt.

2.2.3 Antikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Die folgenden Antikörper wurden für die Immunhistochemie (siehe Kapitel 3.3.2) und Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 3.3.3) genutzt. Zur Optimierung der Färbung erfolgten die Fixierung der Schnitte sowie die Inkubation mit Antikörpern mit unterschiedlichen Verdünnungen, welche ebenfalls in der folgenden Liste (Antikörper, Klon, Fixierung, Verdünnung, Hersteller) dokumentiert sind.

Detektion der Mastzellen:

- Anti-CD117 mouse IgG1, YB5B8, Methanol, 1000 ng/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland.
- Anti-Chymase mouse IgG, CC1, Methanol, 1:500, Dianova, Hamburg, Deutschland.
- Anti-Tryptase mouse monoclonal IgG1, AA1, Methanol, 1:1000, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA.

Detektion der PEK-Zellen:

- Anti-Cytokeratin 17 (CK17) rabbit polyclonal IgG, N-terminal, Aceton, 1:250, Epitomics, Burlingame, USA.

Detektion spezifischer Rezeptoren/Proteine:

- Anti-AT2R goat polyclonal IgG, N-19, Aceton, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA.
- Anti-Integrin-β4 mouse monoclonal IgG1, ASC-8, Methanol, 1 : 200, Chemicon International, Temecula, USA.

- Anti-VEGFR2 rabbit, 55B11, Aceton, 1 : 100, Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland.
- Anti- β -Catenin mouse monoclonal IgG2a, 17C2, Methanol, 1:100, Dianova, Hamburg, Deutschland.

Differenzierungsmarker der Keratinozyten:

- Anti-Cytokeratin 10 (CK10) rabbit monoclonal IgG, EP1607IHCY, Aceton, 1 : 500, Abcam, Cambridge, England.
- Anti-Transglutaminase 1 mouse monoclonal IgG2a, B.C1, Methanol, 1:100, Biomedical Technologies, Stoughton, USA.

Proliferationsmarker:

- Anti-BrdU mouse monoclonal, IgG1, AB-3, Methanol, 1:100, Calbiochem, San Diego, USA.
- Anti-Human Ki-67 Antigen mouse monoclonal, MIB-1, Methanol, 1:100, Dako, Hamburg, Deutschland.

2.3 Verbrauchsmaterialien

- Einmalpipetten Falcon (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland.
- Einwegskalpell, Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Division, Japan.
- Kryoröhrchen (1,6 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland.
- Pipettenspitzen (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l), Eppendorf, Hamburg, Deutschland.
- Polypropylenröhrchen Falcon (15 ml, 50 ml), Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland.
- Zellkulturflasche CELLSTAR[®] Filter Top (75 cm²), Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland.
- Zellkulturflasche CELLSTAR[®] Suspensionskultur (250 ml), Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland.
- Zellkulturplatte (6- und 24-Well), Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland.
- Zellkulturschale (94 x 16 mm), Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland.

2.4 Geräte

- Absaugsystem Vacusafe Comfort, INTEGRA Biosciences, Fernwald, Deutschland.
- AutoMacs, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland.
- Mikroskop Axiovert 10, Carl Zeiss, Jena, Deutschland.
- Brutschrank Heraeus 6000, Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland.
- Casy[®]1-Zellsystem TTC, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland.
- Neubauer-Zählkammer, Assistent, Sondheim, Deutschland.
- pH-Messgerät (digital) MV 870, Präcitronic, Dresden, Deutschland.
- Pipettierhilfe pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland.
- Schüttelinkubator Innova 4000, New Brunswick Scientific, Edison, USA.
- Schüttler MTS 4, IKA Werke, Staufen, Deutschland.
- Sterilbank, Karl Bleyemehl Reinraumtechnik GmbH, Inden, Deutschland.
- Ultramikrowaage, Sartorius, Göttingen, Deutschland.
- Vortexer REAX 2000, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland.
- Wasserbad MS Lauda, M&S Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland.
- Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland.
- Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland.
- Zentrifuge Minifuge RF, Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland.

3 Methode

Die Isolierung der Zellen und die Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden standardisiert im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37 °C inkubiert. Mastzellen, Keratinozyten sowie Fibroblasten wurden aus humanen Vorhäuten (Materialgewinn nach einer Zirkumzision) isoliert. Die Nutzung der biologischen Materialien zum Zweck der Laborforschung und einer Veröffentlichung ohne namentliche Angaben wurde durch die Ethikkommission zugelassen.

Durchgeführt wurden die folgenden Schritte:

- Isolierung der Mastzellen, Fibroblasten und Keratinozyten
- Zellkultur mit Mastzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und zwei Zelllinien, squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom) SCC12 sowie SCC13
- Etablierung einer organotypischen Kultur
- Untersuchungen in der organotypischen Kultur
- Untersuchungen in der Monokultur
- Evaluation durch Immunhistochemie, Immunfluoreszenz sowie TUNEL

3.1 Zellisolierung und Zellkultur

3.1.1 Isolierung und Kultur der Mastzellen

Die Isolierung von Mastzellen wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben [190,191]. Für die Isolierung der dermalen Mastzellen wurde das modifizierte Protokoll unserer Arbeitsgruppe angewandt [192], welches auf den genannten Arbeiten basiert. Bei Mastzellen handelt es sich um eine Zellsuspensionskultur. Die Mastzellen wurden für mindestens zwei Wochen in Kulturflaschen inkubiert, bevor die Kultur für die Experimente eingesetzt wurde [192].

Für die Isolierung der Mastzellen wurde sorgfältig das Fettgewebe der Haut entfernt. Die Hautstücke wurden in einer Petrischale ausgespannt und in ca. 2 × 0,5 cm große Vierecke geschnitten. Dann erfolgten mehrere vertikale Schnitte mit einem Abstand von ca. 1–2 mm, wobei ein horizontaler Rand nicht vollständig durchgetrennt wurde, damit alle Stücke verbunden blieben. Diese Hautstücke wurden über Nacht in der Dispase-Lösung (siehe Kapitel 2.1.1) in einem 50-ml-Polypropylen-Röhrchen bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst die epidermale Schicht mit Pinzetten vorsichtig vom

dermalen Gewebe entfernt. Aufgrund der CD117-Positivität der Melanozyten sollte die epidermale Schicht möglichst vollständig entfernt werden [58]. Die entfernte Epidermis wurde für die Isolierung der Keratinozyten aufgehoben (siehe Kapitel 3.1.2). Das deepithelisierte dermale Gewebe wurde mit einer Schere möglichst fein bis zu einer teigartigen Konsistenz geschnitten. Diese Arbeit sollte mindestens 30 min pro 15 g Gewebe dauern. Ein Stück der deepithelisierten Dermis wurde für die Isolierung der Fibroblasten aufgehoben (siehe Kapitel 3.1.3). Das fein geschnittene dermale Gewebe wurde mit dem vorgewärmten Dispersionsmedium (siehe Kapitel 2.1.1) (ca. 10 ml pro 1 g Gewebe) in eine 500-ml-Flasche gegeben und in einem Schüttelwasserbad für ca. 60 min bei 37 °C mit maximaler Schüttelfrequenz inkubiert. Die Lösung mit Hautresten und freien Zellen wurde durch eine zweiteilige Siebkonstruktion (oben 300 µm Maschenweite, darunter 40 µm) gefiltert. Das Filtrat wurde danach in einem 50-ml-Tube für 15 min bei 1400 U/min (ca. 350 × g) und 4 °C zentrifugiert. Diese Schritte mit Dispersionsmedium wurden mit den gefilterten Hautresten bis zu dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml PBS- suspendiert und für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (250 × g). Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 50 ml MACS-Puffer suspendiert und die Suspension in einem 50-ml-Tube für 15 min bei 1400 U/min (ca. 350 × g) und 4 °C zentrifugiert. Dieser Wasch-Zentrifugations-Vorgang wurde zweimal wiederholt und dabei die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden dann in wenig MACS-Puffer (350 µl pro 10⁸ Zellen) suspendiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden Human AB Serum (150 µl pro 10⁸ Zellen) und Sandoglobulin® (10 µl pro 10⁸ Zellen) hinzugegeben. Die Suspension wurde sorgfältig gemischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden CD117-MicroBeads (25 µl pro 500 µl Zellsuspension) hinzugegeben und die Suspension für weitere 11 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 50 ml MACS-Puffer gewaschen und für 15 min bei 1400 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann wieder in MACS-Puffer aufgenommen (500 µl pro 10⁸ Zellen). Die Zellsuspension, in welcher sich die mit CD117-MicroBeads markierte Mastzellen befanden, wurde über die MACS-Säule durch ein magnetisches Feld geführt. Durch mehrfaches Waschen wurden die mit CD117-MicroBeads markierten Mastzellen von anderen dermalen Zellen getrennt und in 10 ml Iscove's Basal Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen. Die Suspension wurde für 10 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in einer Zellkulturflasche im Mastzellen-Medium (siehe Kapitel 2.1.5) suspendiert (1 ml pro 1 × 10⁶ Zellen).

Die Mastzellen wurden im Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Alle 2–3 Tage wurden SCF und IL-4 ins Medium gegeben. Einmal in der Woche wurde die Suspension für 10 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Mastzellen-Medium aufgenommen (siehe Kapitel 2.1.5).

3.1.2 Isolierung und Kultur der Keratinozyten

Für die Isolierung der Keratinozyten wurde die Methode von Normand und Karasek [193] modifiziert durchgeführt. Nur die Passagen 2 bis 5 wurden für die vorliegende Arbeit genutzt.

Die Keratinozyten wurden aus der gewonnenen Epidermis isoliert (siehe Abschnitt 3.1.1). 10–15 kleine Epidermisstücke (1 × 5 mm) wurden mit PBS- gewaschen und in 5 ml 0,05 % Trypsin/0,01 % EDTA für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 5 ml SBTI-Lösung zugegeben. Diese Lösung mit Epidermis wurde durch die Siebkonstruktion (100 µm) gefiltert und die gefilterte Suspension anschließend für 10 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert und noch einmal mit PBS- gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die Keratinozyten im Keratinozytenmedium (siehe Abschnitt 2.1.5) suspendiert (20 ml pro 1 × 10⁶ Zellen). Die Zellsuspension wurde in eine 175-cm²-Kulturflasche gegeben und bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert.

Für die erste Passage war eine Kollagenbeschichtung der Kulturflasche erforderlich, um die Adhärenzrate zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden die Flaschen mit einer Kollagenlösung (140 µl Kollagen Typ I und 10 ml 0,03 N Essigsäure) unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur für 30 min behandelt. Die Flasche wurde danach dreimal mit PBS- für jeweils 5 min gewaschen.

Die Keratinozyten wurden unter den Standardkulturbedingungen (5 % CO₂ bei 37 °C) kultiviert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Da die Keratinozyten nicht bis zur konfluenten Dichte kultiviert werden sollten, um eine Einleitung der Differenzierung zu vermeiden [194], wurden sie bei einem Zustand von ca. 70–80 % Konfluenz (nach einer Woche unter den gegebenen Bedingungen) trypsiniert (siehe Abschnitt 3.1.5) und neu eingesät.

3.1.3 Isolierung und Kultur der Fibroblasten

Für die Isolierung der Fibroblasten wurde die Methode von Normand und Karasek [193] modifiziert durchgeführt. Nur die Zellen der Passagen 1–9 wurden für die vorliegende Arbeit genutzt.

Für die Isolierung der Fibroblasten wurde das o.g. dermale Gewebe genutzt (siehe Kapitel 3.1.1). Die deepithelisierte Dermis wurde mit einem Skalpell in ca. $3 \times 3 \times 3$ mm große Stücke geschnitten und in eine Petrischale ausgespannt. Die Petrischale wurde in einer Sterilbank für 5 min stehen gelassen, sodass die deepithelisierte Dermis an der Kulturoberfläche anheften konnte. Anschließend wurde das Fibroblasten-Medium (siehe Kapitel 2.1.5) zugegeben, wobei vorsichtig vorgegangen wurde, um ein Wiederablösen der Dermisstücke von der Kulturoberfläche zu vermeiden. Es folgte eine Kultivierung für mehrere Tage bei 37 °C mit 5% CO₂. Das Medium wurde alle 2–3 Tage vorsichtig gewechselt. Mit der Zeit wuchsen die Fibroblasten auf der Kulturoberfläche aus. Bei Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und für die weitere Inkubation in neue Petrischalen oder Kulturflaschen überführt (siehe Kapitel 3.1.5).

3.1.4 Kultur der SCC12- und SCC13-Zellen

Für die Untersuchung des PEK der Haut wurden die beiden Zelllinien SCC12 und SCC13 benutzt. Diese Zelllinien wurden im Jahr 1981 aus im Kopfbereich manifestierten Hauttumoren isoliert und als gut differenzierte PEK identifiziert [168]. In einer zuvor durchgeführten Testung durch das Leibniz-Institut in Braunschweig wurde bestätigt, dass die beiden Zelllinien kontaminationsfrei waren.

Zur Identifizierung der SCC-Zellen bzw. zu deren Unterscheidung von Keratinozyten (siehe Kapitel 4.1.4, 4.2.1 und 4.2.2) wurden die beiden Zelllinien vorher mit einem für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codierenden Gen transfiziert. Die Transfektion von GFP in SCC12 und SCC13 erfolgte dankenswerterweise durch Dr. rer. nat. Matthias Truss von der Charité (Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie). Die transfizierten Zellen wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die SCC12- und SCC13-Zellen wurden im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert. Für die Kultur wurde das Fibroblasten-Medium (siehe Kapitel 2.1.5) genutzt. Das Medium wurde alle 2–3 Tage gewechselt. Bei Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und für die

weitere Inkubation in neue Petrischalen oder Kulturflaschen überführt (siehe Kapitel 3.1.5).

3.1.5 Trypsinierung der Keratinozyten, Fibroblasten sowie SCC12- und SCC13-Zellen

Die Trypsinierung und das Passagieren der adhärennten Zellen in neue Zellkulturgefäße wurden wie folgt durchgeführt:

Das Kulturmedium wurde mit einem Absauger entfernt und die Kulturflasche einmal mit PBS- gewaschen. Anschließend wurde die Kultur mit 4 ml 0,05 % Trypsin/0,01 % EDTA vollständig bedeckt. Es folgte eine Inkubation für 3–5 min bei 37 °C. Dabei wurde die Kulturflasche leicht geklopft, um die Zellen von der Oberfläche zu lösen. Zur Aufhebung der Trypsin-Wirkung wurden 4 ml Fibroblasten-Medium (siehe Kapitel 2.1.5) (für Fibroblasten sowie SCC12- und SCC13-Zellen) bzw. 4 ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (SBTI)-Lösung (für Keratinozyten) zugegeben. Diese Suspension wurde für 10 min bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen im jeweiligen Medium resuspendiert (20 ml pro 1×10^6 Keratinozyten/Fibroblasten bzw. 5×10^5 SCC12-/SCC13-Zellen; 175-cm²-Kulturflasche für adhärennte Zellen).

3.1.6 Kryokonservierung der Keratinozyten, Fibroblasten sowie SCC12- und SCC13-Zellen

Die Keratinozyten, Fibroblasten sowie SCC12- und SCC13-Zellen wurden gegebenenfalls kryokonserviert. Die trypsinisierten Zellen wurden im Serum-free Freezing Medium aufgenommen (1 ml pro 1×10^6 Zellen). Dann wurde 1 ml dieser Suspension in ein Kryoröhrchen pipettiert und in einem „Cryo 1°C Freezing Container“ für 24 h bei –80 °C und danach bei –140 °C gelagert.

3.2 Organotypische Kultur

Ein „Hautäquivalent“ (engl. skin equivalent) wurde in drei Schichten angelegt (siehe Abbildung 1): (1) einer azellulären Schicht, welche als Unterlage der Kultur diente und eine Überwanderung der Zellen ins Kulturmedium verhinderte, (2) einem „Dermisäquivalent“ (engl. dermis equivalent), welches Fibroblasten und gegebenenfalls auch Mastzellen enthielt, und (3) einer epidermalen Schicht, die aus Keratinozyten und PEK-Zellen bestand. Durch das „Air-Lifting“ reichte das Medium nur bis auf die Höhe der

azellulären Schicht, sodass die epitheliale Oberfläche an der Luft freilag. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage erneuert.

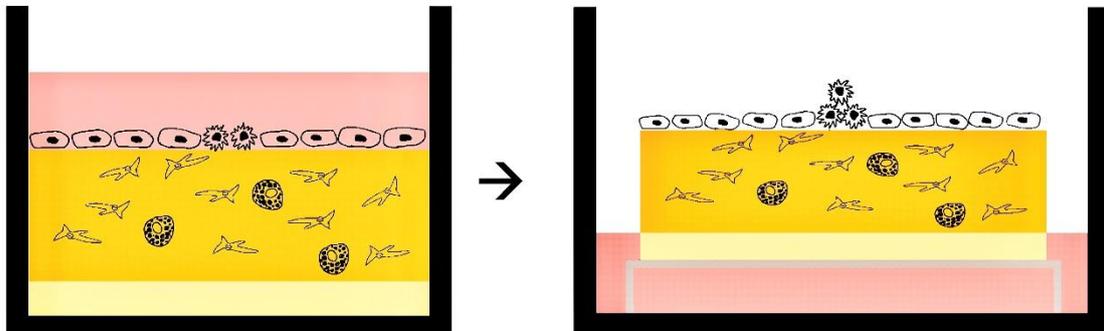


Abbildung 1: Schematische Darstellung der organotypischen Kultur mit einer azellulären Schicht (hellgelb), einem Dermisäquivalent (gelb) mit Fibroblasten (↗) und Mastzellen (⊙) und einer epidermalen Schicht mit Keratinozyten (◻) und Plattenepithelkarzinom-Zellen (⊙). Am ersten Tag wurde die gesamte Kultur im Medium (rot) inkubiert. Nach dem Air-Lifting am nächsten Tag wurde das Medium nur bis auf die Höhe der azellulären Schicht zugegeben, sodass die Keratinozyten und Plattenepithelkarzinom-Zellen mit der Luft in Kontakt kamen.

3.2.1 Dermisäquivalent ohne Mastzellen

Zur Herstellung des Dermisäquivalentes wurde eine Kollagen-Matrigel-Mixtur als Einbettmaterial eingesetzt. Alle Materialien für die Herstellung des Dermisäquivalentes wurden auf Eis gestellt, um die Konsistenz der Materialien flüssig zu halten. Die folgenden Materialien wurden gemischt.

	<u>Volumenteil</u>
Kollagen Typ I	10
10x DMEM	1
1 M NaOH	ca. 1 (bis auf einen pH-Wert von 7,0)
Matrigel ⁶	1

Mit jeweils 200 µl der o.g. Kollagen-Matrigel-Mixtur wurde eine 24-Well-Kulturplatte beschichtet und die Platte bei 37 °C für 10 min zum Festwerden gelagert (azelluläre Schicht). Für das Dermisäquivalent wurden 100 µl Fibroblasten-Suspension ($2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml FCS) und 600 µl der Kollagen-Matrigel-Mixtur in einem 2-ml-Eppendorf-

⁶ Matrigel wurde nach der pH-Einstellung gemischt.

Röhrchen möglichst schnell gemischt. Unverzüglich wurde dieses Gemisch vorsichtig auf die azelluläre Schicht in der 24-Well-Kulturplatte pipettiert. Zum Festwerden wurde die 24-Well-Kulturplatte bei 37 °C für 30 min gelagert.

3.2.2 Dermisäquivalent mit Mastzellen

Um Mastzellen in die organotypische Kultur zu integrieren, wurden die Zellen zusammen mit den Fibroblasten in FCS suspendiert ($2,5 \times 10^6$ Fibroblasten und $2,5 \times 10^6$ Mastzellen pro ml FCS). Ansonsten wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben vorgegangen.

3.2.3 Epithelisierung mit Keratinozyten und SCC12-/SCC13-Zellen

Insgesamt wurden 5×10^5 Zellen – je nach Untersuchung entweder Keratinozyten, SCC12-Zellen, SCC13-Zellen oder eine 9:1-Mischung von Keratinozyten und SCC12- bzw. SCC13-Zellen – für die Epithelisierung verwendet.

Zuerst wurde zum Dermisäquivalent (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) vorsichtig 1 ml Fibroblasten-Medium bzw. – im Falle einer Epithelisierung mit Keratinozyten – Keratinozyten-Medium mit Ascorbinsäure (Endkonzentration: 50 µg/ml) gegeben. Nach 1 h wurde das Medium durch eine Zellsuspension aus Keratinozyten bzw. SCC12-/SCC13-Zellen ersetzt. Die gesamte Co-Kultur wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert.

3.2.4 Air-Lifting

Nach einer 24-stündigen Inkubation der Co-Kultur erfolgte ein sogenanntes Air-Lifting. Zuerst wurde das epithelisierte Dermisäquivalent mit einer 10-µl-Pipettenspitze vorsichtig von der Kulturoberfläche gelöst und für 1–2 h bei 37 °C im Medium stehen gelassen, wobei es bis auf ca. zwei Drittel seiner ursprünglichen Größe schrumpfte.

Ein Metallgitter (siehe Kapitel 2.1.4) wurde in eine 6-Well-Platte gestellt und mit einem vorbehandelten Nylonnetz (siehe Kapitel 2.1.4) bedeckt. Anschließend wurde das Hautäquivalent auf das Nylonnetz in die 6-Well-Platte übertragen. Ca. 5 ml Medium für organotypische Kulturen (siehe Kapitel 2.1.5) wurde zugegeben, sodass die epitheliale Oberfläche mit der Luft in Kontakt treten konnte. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert. 6–8 Tage nach dem Air-Lifting wurde die Kultur histologisch bearbeitet.

3.3 Histologische Untersuchungen

3.3.1 Vorbereitung der histologischen Untersuchungen

Für die Herstellung der Kryoschnitte wurden die Proben im Einbettmedium eingefroren. Zuerst wurden die Proben mit dem Nylonnetz auf ein Glasobjekt gestellt. Der unbedeckte Teil des Nylonnetzes wurde mit einem Skalpell und einer Pinzette abgeschnitten. Anschließend wurden die Proben in einer Gießform (Cryomold, siehe Kapitel 2.2.1) mit Einbettmedium ohne Luftblasen vollständig eingebettet und mit flüssigem Stickstoff rasch eingefroren, wobei nur der Boden der Gießform mit Stickstoff in Berührung kam. Um den Experimentator vor Kälteschäden zu schützen, wurde ein ca. 20 cm langer Griffdraht an die Gießform angebaut.

Von den eingefrorenen Proben wurden Serienschnitte von 4–6 µm Dicke hergestellt. Die Kryoschnitte wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen Antikörper für die Färbung für 10 min bei –20 °C mit Methanol, Aceton bzw. Formaldehyd fixiert (siehe Kapitel 2.2.3) und für 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden sie bei –80 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Vor der Durchführung der histologischen Untersuchungen wurden die Schnitte mit dem PAP-Pen umrandet, um ein Abfließen der Lösungen zu verhindern, und für 10 min im Tris-Puffer gelagert.

3.3.2 Immunhistochemische Untersuchung

Immunhistologische Färbungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei der Durchführung der Färbungen wurde streng darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrockneten. Es wurde ausreichend Lösung zugegeben, um die Gewebeproben stets vollständig zu bedecken (ca. 100 µl pro Schnitt).

Eine Denaturierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde nur für die Untersuchung mit dem BrdU-Antikörper durchgeführt (ansonsten sind die folgenden Anweisungen zu überspringen). Zunächst wurde zur Denaturierung der DNA 100 µl HCl (2,5 N) zugegeben. Nach 10 min wurden die Schnitte gewaschen.⁷ Zur Vermeidung einer unspezifischen Untergrundfärbung wurde das Peroxidase-Blocking-Reagenz

⁷ Nach Entfernung der vorher zugegebenen Lösung (kräftiges Schütteln) wurden die Schnitte im Tris-Puffer zweimal für jeweils 5 min gewaschen. Die folgenden Waschschriffe erfolgten auf die gleiche Weise.

zugegeben. Nach 10 min wurden die Schnitte gewaschen. Zur Blockierung des endogenen Biotins erfolgte zuerst eine Inkubation mit Avidin D für 10 min. Anschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen. Dann wurden sie für 10 min mit Biotin inkubiert und anschließend abermals gewaschen. Zur Blockierung endogener Fc-Rezeptoren wurden sie in der Fc-Rezeptor-Block-Lösung für 15 min inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung wurden 100 µl des Primärantikörpers zugegeben (für die Verdünnungen siehe Kapitel 2.2.3) und die Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Schnitte für 10 min mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (100 µl) inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Danach wurden sie für 10 min mit Streptavidin-HRP (100 µl) inkubiert. Die Inkubationsdauer hing von der entstehenden Farbintensität ab – unter den o.g. Bedingungen mit den genannten Antikörpern war eine Inkubationszeit von 15 min meist ausreichend. Zur Hintergrundfärbung der Gewebestrukturen wurde Hämatoxylin genutzt. Nach einem 5-minütigen Waschvorgang wurden die Schnitte für 2 min mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend in laufendem Leitungswasser für 10 min gewaschen. Nach Entfernung des Wassers wurde ein Tropfen Eindeckmittel zugegeben und die Schnitte mit einem Deckglas bedeckt.

3.3.3 Immunfluoreszenz

Zur Blockierung endogener Fc-Rezeptoren wurden die Schnitte mit der Fc-Rezeptor-Block-Lösung für 15 min inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung wurden 100 µl des Primärantikörpers zugegeben (für die Verdünnungen siehe Kapitel 2.2.3) und die Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte im Tris-Puffer für 10 min gewaschen. Dann wurde der Sekundärantikörper (100 µl) (siehe Kapitel 2.2.2) zugegeben und die Schnitte für 30 min in einer dunklen Kammer inkubiert. Nach einer kurzen Spülung mit Tris-Puffer wurde ein Tropfen Eindeckmittel mit DAPI (blau) zugegeben und die Schnitte mit einem Deckglas bedeckt.

3.3.4 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

Für die TUNEL-Färbung wurde das ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit nach Herstellerangaben mit wenigen Modifikationen genutzt. Nach Fixierung mit 1%igem Formaldehyd für 10 min wurden die Schnitte zweimal mit PBS- für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wurden 100 µl „Equilibration Buffer“ zugegeben. Nach 10

Sekunden wurde die Lösung wieder entfernt und 100 µl „Working Strength TdT Enzyme“ (Reaction Buffer + TdT Enzyme, v/v 7 : 3) zugefügt. Nach Lagerung der Schnitte für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer wurden sie mit „Working Strength Stop/Wash Buffer“ (1 ml Stop/Wash Buffer + 34 ml destilliertes H₂O) für 10 min inkubiert und anschließend dreimal mit PBS- für jeweils 1 min gewaschen. Nun wurden 100 µl „Working Strength Anti-Digoxigenin Conjugate“ zugegeben und die Schnitte für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Ab diesem Schritt wurde eine Lichtexposition streng vermieden. Nach viermaligem Waschen der Schnitte mit PBS- für jeweils 2 min wurde ein Einbettmedium, welches bereits DAPI beinhaltetete, zugegeben und die Schnitte mit einem Deckglas abgedeckt.

3.3.5 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation erfolgte mit dem Mikroskop Axiovert 10 (siehe Kapitel 2.4). Um die Vergrößerung des jeweiligen Bildes anzuzeigen, wurde ein Maßstab eingesetzt.

3.4 Untersuchung in der Monokultur

Um Verhaltensunterschiede bezüglich der Proliferation der Keratinozyten bzw. des PEK in einer organotypischen und einer Monolayer-Kultur zu vergleichen, wurden SCC12- bzw. SCC13-Zellen in einer 6-Well-Platte mit dem Fibroblasten-Medium eingesät. Alle 2 Tage wurden die Medien erneuert. Am 6. Tag wurden die Zellen trypsinisiert und die Anzahl der Zellen bestimmt. Histamin (Endkonzentration: 1×10^{-5} M) bzw. C21 (Endkonzentration: 1×10^{-6} M) wurde gegebenenfalls an den Tagen 0, 2 und 4 zugegeben.

3.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Bewertung wurden die beiden Programme GraphPad PRISM 8 und Microsoft Excel genutzt. Die statistische Analyse aller Datensätze erfolgte mittels des ungepaarten *t*-Tests, wobei eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (probability value) von $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer organotypischen Kultur der Haut und der Hauttumoren

4.1.1 Organotypische Kultur der Haut und Integration der Mastzellen

Für die Optimierung der organotypischen Kultur mit Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen wurden zwei verschiedene Kulturmedien evaluiert – das „FAD-Medium“ und das „KGM ohne BPE“ (siehe Kapitel 2.1.5) –, die bereits andere Forscher zur Etablierung organotypischer Kulturen benutzt hatten [195,196]. In beiden Medien war eine epidermale Differenzierung mit einem starken Wachstum der Keratinozyten im basalen Bereich zu erkennen (Abbildung 2A und B).

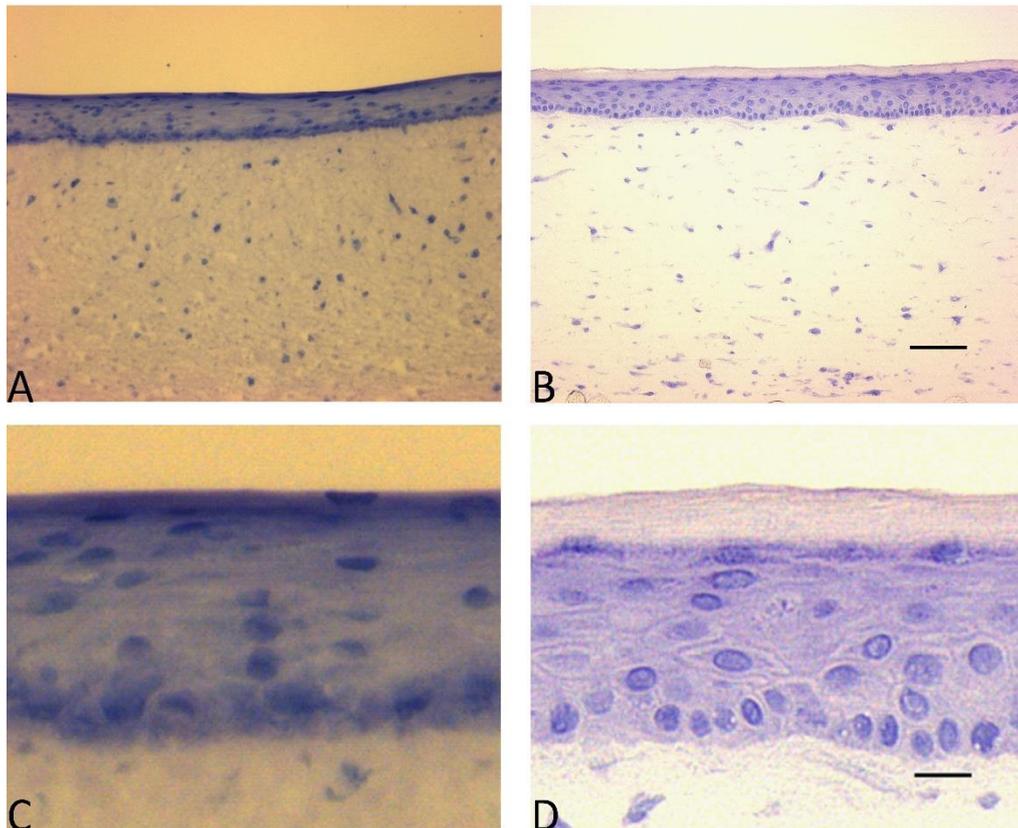


Abbildung 2: Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen mit „FAD-Medium“ (A und C) bzw. mit „KGM ohne BPE“ (B und D). Färbung mit Hämatoxylin. C und D stellen Ausschnitte von A bzw. B dar. Maßstab: 100 µm (A und B) bzw. 20 µm (C und D).

Bei Verwendung des „KGM ohne BPE“ zeigten die Keratinozyten eine gute Differenzierung (Abbildung 2B und D). Im mittleren Bereich der Epidermis, welcher dem Stratum spinosum/granulosum der Haut entspricht, trat typischerweise eine

Differenzierung der Keratinozyten auf. Anzeichen waren eine kubische Form der Zellen sowie ein beginnendes Auflösen der Zellkerne. In der oberflächlichen Schicht, die dem Stratum corneum entspricht, waren keine Zellkerne mehr sichtbar und es erfolgte eine Verhornung. Im Vergleich dazu war die Differenzierung der Keratinozyten bei Verwendung des „FAD-Mediums“ weniger deutlich ausgeprägt, sodass noch in der obersten Schicht Zellkerne sichtbar waren und eine Verhornung ausblieb (Abbildung 2A und C). Dieses Phänomen zeigte sich in den Kulturen mit „FAD-Medium“ ohne identifizierbare Ursachen bzw. Fehler häufig, sodass in Wiederholungsversuchen keine einheitlichen Ergebnisse erzielt wurden.

Zur Identifikation der Mastzellen in der organotypischen Kultur wurden die Mastzell-typischen Marker Tryptase und Chymase mit einem immunhistochemischen Verfahren analysiert (Abbildung 3). Es traten in beiden Kulturen Tryptase-positive Zellen auf; es bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Zellen (Abbildung 3A und B).⁸ Die Mastzellen im Dermisäquivalent waren zudem auch Chymase-positiv (Abbildung 3C). Die Verteilung der Mastzellen innerhalb des Dermisäquivalents war homogen.

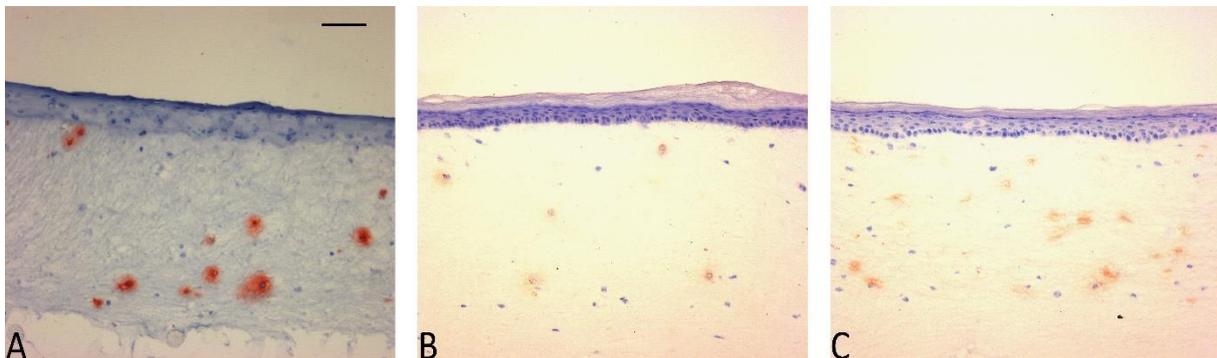


Abbildung 3: Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen mit „FAD-Medium“ (A) und mit „KGM ohne BPE“ (B und C). Immunhistochemische Färbung (AEC) mit Antikörper gegen Tryptase (A und B, rote Färbung) bzw. Chymase (C, rote Färbung). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

Die Morphologie der Fibroblasten zeigte in den beiden Kulturen keine Unterschiede. Jedoch lag die Anzahl der Fibroblasten in der Kultur mit „FAD-Medium“ um den Faktor 2,3 höher als in der Kultur mit „KGM ohne BPE“ (Abbildung 4). Da die organotypische

⁸ Anzahl der Tryptase-positiven Zellen von sechs zufällig aufgenommenen Schnittbildern (ca. 870 \times 690 μ m) aus zwei verschiedenen Versuchen: 16,50 \pm 3,55 (FAD-Medium) vs. 15,67 \pm 5,01 (KGM ohne BPE) ($p = 0,769$).

Kultur mit „KGM ohne BPE“ bei einer Wiederholung der Versuche reproduzierbare Ergebnisse lieferte und eine in-vivo-ähnliche Morphologie der Haut zeigte, wurden die weiteren Untersuchungen mit diesem Medium durchgeführt.

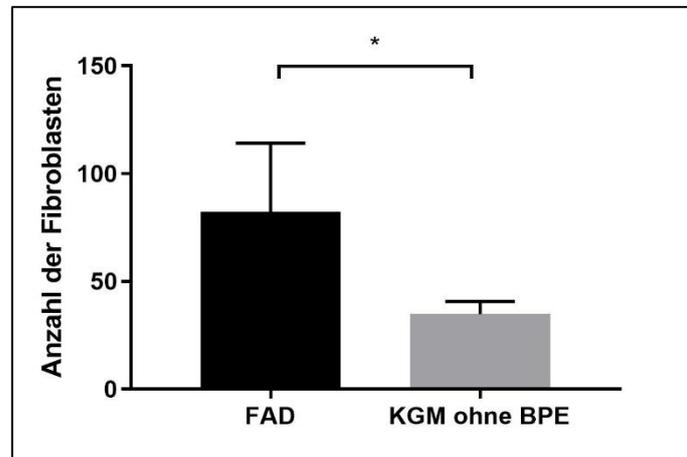


Abbildung 4: Anzahl der Fibroblasten in den organotypischen Kulturen mit „FAD-Medium“ bzw. mit „KGM ohne BPE“. Anzahl der Hämatoxylin-gefärbten Zellen im Dermisäquivalent abzüglich der Anzahl der Tryptase- bzw. Chymase-positiven Zellen (Mastzellen) von zufällig aufgenommenen Schnittbildern (ca. 870 × 690 µm); n = 4, 82,25 ± 31,95 vs. 34,75 ± 5,91, * p < 0,05.

Die Proliferation der Keratinozyten wurde durch den Einbau von BrdU in die DNA für 48 h nachgewiesen. Die meisten basalen Keratinozyten waren BrdU-positiv, während es im suprabasalen Bereich kaum BrdU-positive Zellen gab (Abbildung 5A). Das immunhistologische Integrin β4 Signal unter den basalen Keratinozyten verdeutlichte die Produktion extrazellulärer Matrixproteine durch die Keratinozyten und die Ausbildung einer in-vivo-ähnlichen Basalmembran (Abbildung 5B).

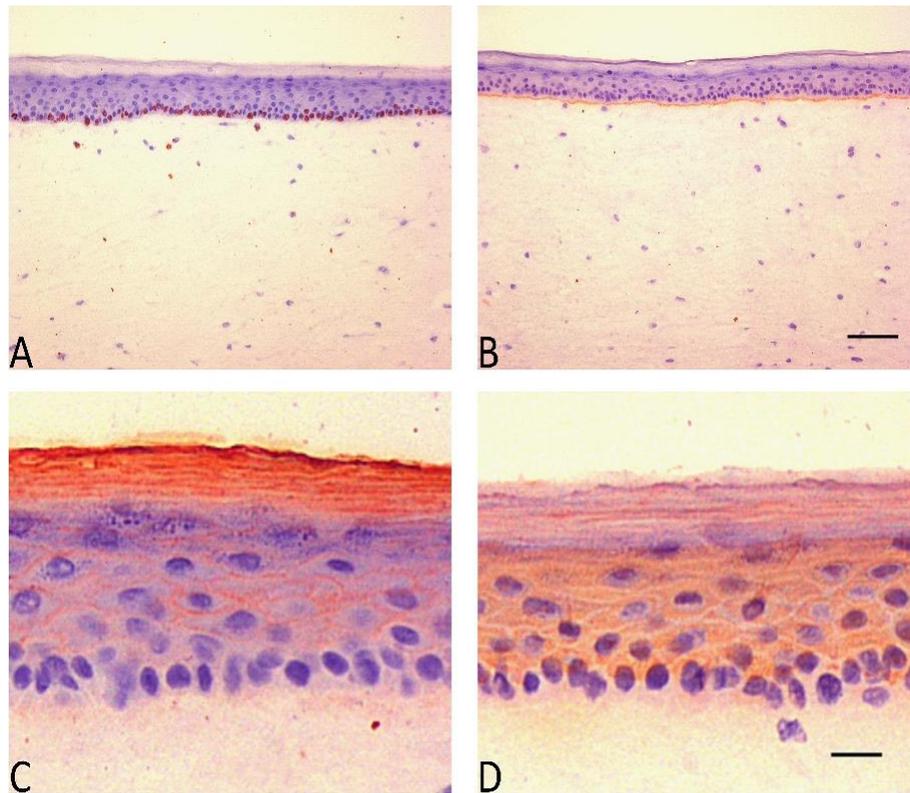


Abbildung 5: Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Keratinozyten und Mastzellen mit „KGM ohne BPE“. Immunohistochemische Färbung (AEC, rot) mit Anti-BrdU (A), Anti-Integrin- β 4 (B), Anti-Transglutaminase (C) und Anti-CK10 (D). BrdU-Einbau für 48 h (A). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m (A und B) bzw. 20 μ m (C und D).

Um die Differenzierung der epidermalen Struktur darzustellen, wurden zusätzlich CK10 und Transglutaminase immunhistologisch markiert (Abbildung 5C und D). Die beiden Differenzierungsmarker waren im suprabasalen Bereich nachweisbar. Die Transglutaminase wird in einer späteren Phase der Differenzierung exprimiert als CK10 (siehe Kapitel 1.2). Das immunohistochemische Ergebnis bildet diese natürliche Entwicklung ab.

4.1.2 Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms und Integration der Mastzellen

Die Integration der Mastzellen in die organotypische Kultur eines PEK der Haut erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Zhang und Kollegen mit einigen Modifikationen [197]. Zur Epithelisierung wurden die beiden PEK-Zelllinien SCC12 bzw. SCC13 genutzt. Die gesamte Kulturdauer betrug nach dem Air-Lifting 6 Tage. Als Kulturmedium wurde FAD-Medium verwendet.

In den beiden Kulturen mit SCC12- bzw. SCC13-Zellen bildete sich eine mehrschichtige epidermale Struktur, jedoch ohne erkennbare Differenzierung (Abbildung 6). Insbesondere in der organotypischen Kultur mit SCC12-Zellen war eine Kondensation der Zellkerne sichtbar, welche auf eine Apoptose hindeutet [198] (siehe Kapitel 4.5.2). In der organotypischen Kultur mit SCC13-Zellen bildete sich eine mehrschichtige epidermale Struktur, die deutlich dicker als die in der Kultur mit SCC12-Zellen war (Abbildung 6).

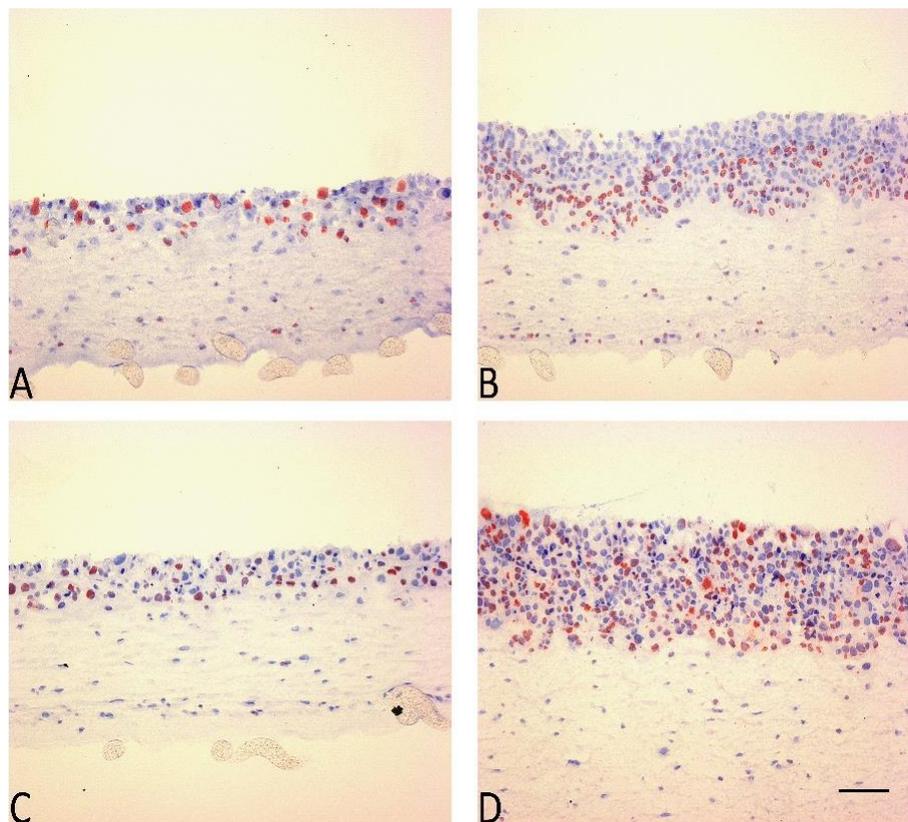


Abbildung 6: Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Mastzellen und SCC12- (A und C) bzw. SCC13-Zellen (B und D). Immunhistochemische Färbung (ACE, rote Signale) mit Antikörpern gegen BrdU (A und B) bzw. Ki-67 (C und D). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 µm.

Der BrdU-Einbau in die DNA belegt die starke Proliferationsaktivität der SCC12- und SCC13-Zellen. Während die positiven SCC12-Zellen homogen verteilt waren (Abbildung 6A), fanden sich die SCC13-Zellen meist im basal-nahen Bereich (Abbildung 6B). Die überwiegende Anzahl der SCC-Zellen in beiden organotypischen Kulturen war Ki-67-positiv, wobei in der Tumorschicht eine homogene Verteilung festzustellen war (Abbildung 6C und D). Die unterschiedliche Verteilung der BrdU- und Ki-67-positiven Zellen dürfte auf die Erfassung unterschiedlicher Proliferationsphasen mit den beiden

Proliferationsmarkern zurückzuführen sein – BrdU wird in der S-Phase des Zellzyklus in die neu hergestellte DNA eingebaut, während Ki-67 in allen proliferationsaktiven Phasen der Zelle (G1-, S-, G2- sowie M-Phase) exprimiert wird [199,200].

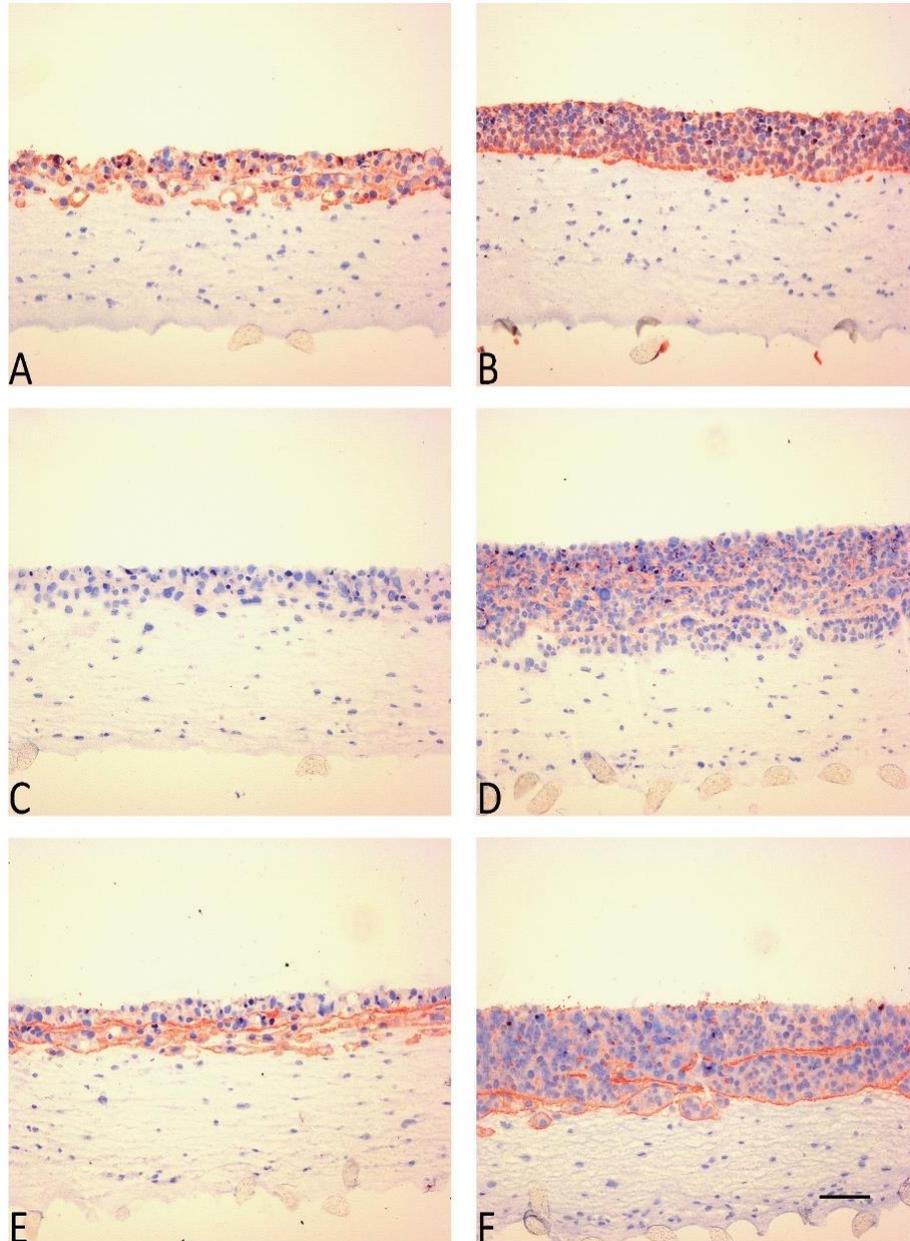


Abbildung 7: Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Mastzellen und SCC12- (A, C, E) bzw. SCC13-Zellen (B, D, F). Immunhistochemische Färbung (ACE, rote Signale) mit Antikörpern gegen CK17 (A und B), β -Catenin (C und D) bzw. Integrin β 4 (E und F). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

Die beiden Zelllinien waren stark CK17-positiv (Abbildung 7A und B), was auf eine hochgradige Malignität der beiden Zelllinien hinweist [201]. Zudem waren beide Zelllinien β -Catenin-positiv, die SCC13-Zellen aber deutlich stärker als die SCC12-Zellen

(Abbildung 7C und D). Auch eine Färbung von Integrin $\beta 4$ lieferte sowohl in den SCC12- als auch in den SCC13-Zellen ein positives Ergebnis. Die Integrin- $\beta 4$ -Produktionen fand in der gesamten epidermalen Schicht (Abbildung 7E und F) und nicht wie bei Keratinozyten im basalen Anteil (Abbildung 5B) statt.

In den organotypischen Kulturen mit SCC12- sowie SCC13-Zellen konnten Tryptase-positive Zellen im Dermisäquivalent nachgewiesen werden (Abbildung 8). Einige dieser Zellen zeigten eine starke Färbung, welche auf eine aktive Synthese der Mastzellmediatoren der Mastzellen hindeutet.

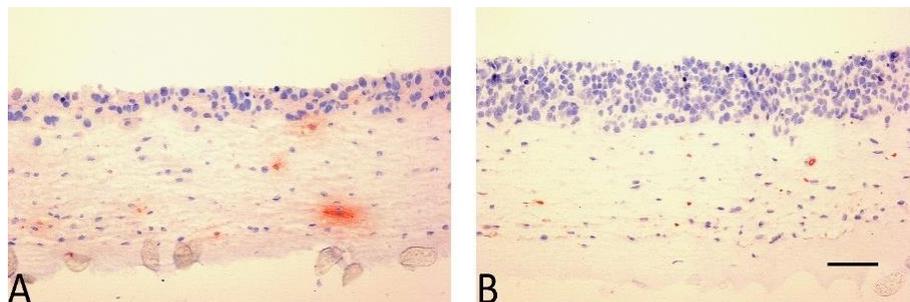


Abbildung 8: Organotypische Kultur mit Fibroblasten, Mastzellen und SCC12- (A) bzw. SCC13-Zellen (B). Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Tryptase (rot). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

4.1.3 Wachstum der SCC12- und SCC13-Zellen in der jeweiligen Monokultur

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der SCC12- und SCC13-Zellen in der Monokultur zu analysieren, wurden jeweils 50 000 Zellen eingesät und die Zellzahl nach 6 Tagen bestimmt (siehe Kapitel 3.4). Für die beiden Zelllinien zeigte sich in der Monokultur kein signifikanter Unterschied im Wachstum (Abbildung 9).

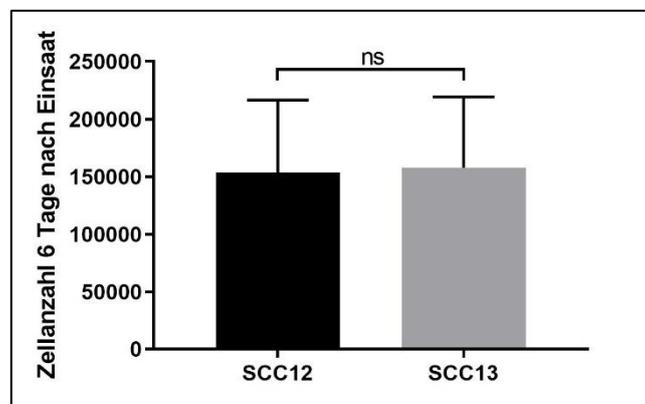


Abbildung 9: Anzahl der SCC12- und SCC13-Zellen 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen; n = 6, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

4.1.4 Organotypische Kultur der Haut und Integration der Mastzellen und Plattenepithelkarzinomzellen

Um Mastzellen und PEK-Zellen gleichzeitig in eine organotypische Kultur der Haut zu integrieren, wurde ein Dermisäquivalent mit Fibroblasten und Mastzellen hergestellt und für die Epithelisierung Keratinozyten und SCC12- bzw. SCC13-Zellen im Verhältnis von 10:1 eingesät. Zur Identifizierung der SCC-Zellen bzw. zu deren Unterscheidung von Keratinozyten wurden die beiden Zelllinien vorher mit einem für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codierenden Gen transfiziert. Die Kulturen wurden nach dem Air-Lifting für weitere 6–8 Tage inkubiert.

Nach der Integration von SCC12- und Mastzellen in die organotypische Kultur der Haut konnten im Dermisäquivalent Tryptase- sowie Chymase-positive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 10A und B). Die epidermale Struktur zeigte eine Differenzierung, jedoch kam es teilweise zu einer unregulierten Differenzierung sowie zu einer mangelnden Verhornung (Abbildung 10A und B). Mit Antikörpern gegen GFP konnten nur vereinzelt GFP-positive Zellen in der epidermalen Struktur detektiert werden (Abbildung 10C).

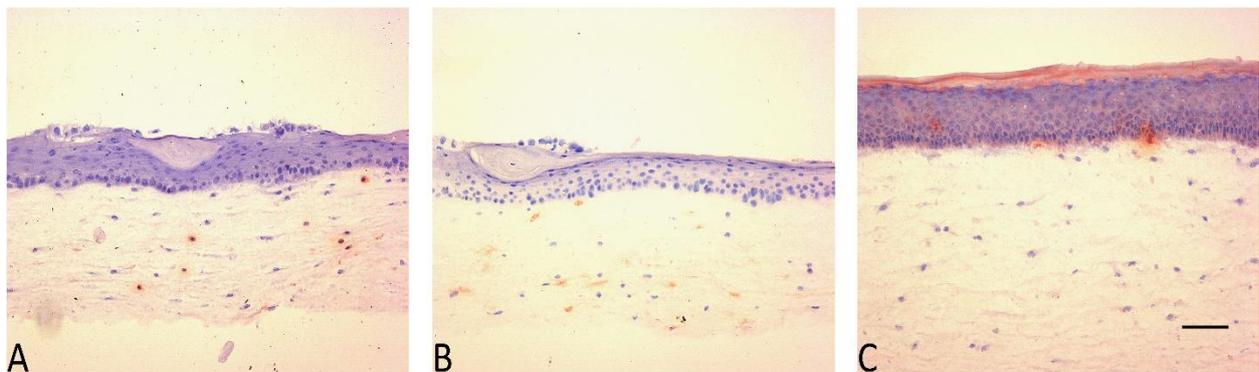


Abbildung 10: Integration der Mastzellen und Plattenepithelkarzinom-(PEK)-Zellen (SCC12) in die organotypische Kultur der Haut. Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Tryptase (A), Chymase (B) bzw. GFP (C) (rote Signale). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 µm.

Bei Verwendung von SCC13-Zellen entwickelte sich eine gut differenzierte epidermale Struktur mit einer deutlich erkennbaren kernlosen Hornschicht (Abbildung 11). Im basalen Bereich fanden sich gruppierte undifferenzierte Zellen, welche mit Anti-GFP als SCC13-Zellen identifiziert wurden (Abbildung 11A und B). Eine Immunfluoreszenz-Färbung mit Anti-Integrin-β4 markierte eine klare Linie (Basalmembran). Die GFP-positiven SCC13-

Zellen fanden sich ausschließlich über dieser Linie, ohne sie zu unterbrechen (Abbildung 11E). Tryptase- und Chymase-positive Zellen waren im Dermisäquivalent sichtbar und homogen verteilt (Abbildung 11C und D). Mit Antikörpern gegen c-kit konnten parallel die Mastzellen detektiert werden (Abbildung 11F).

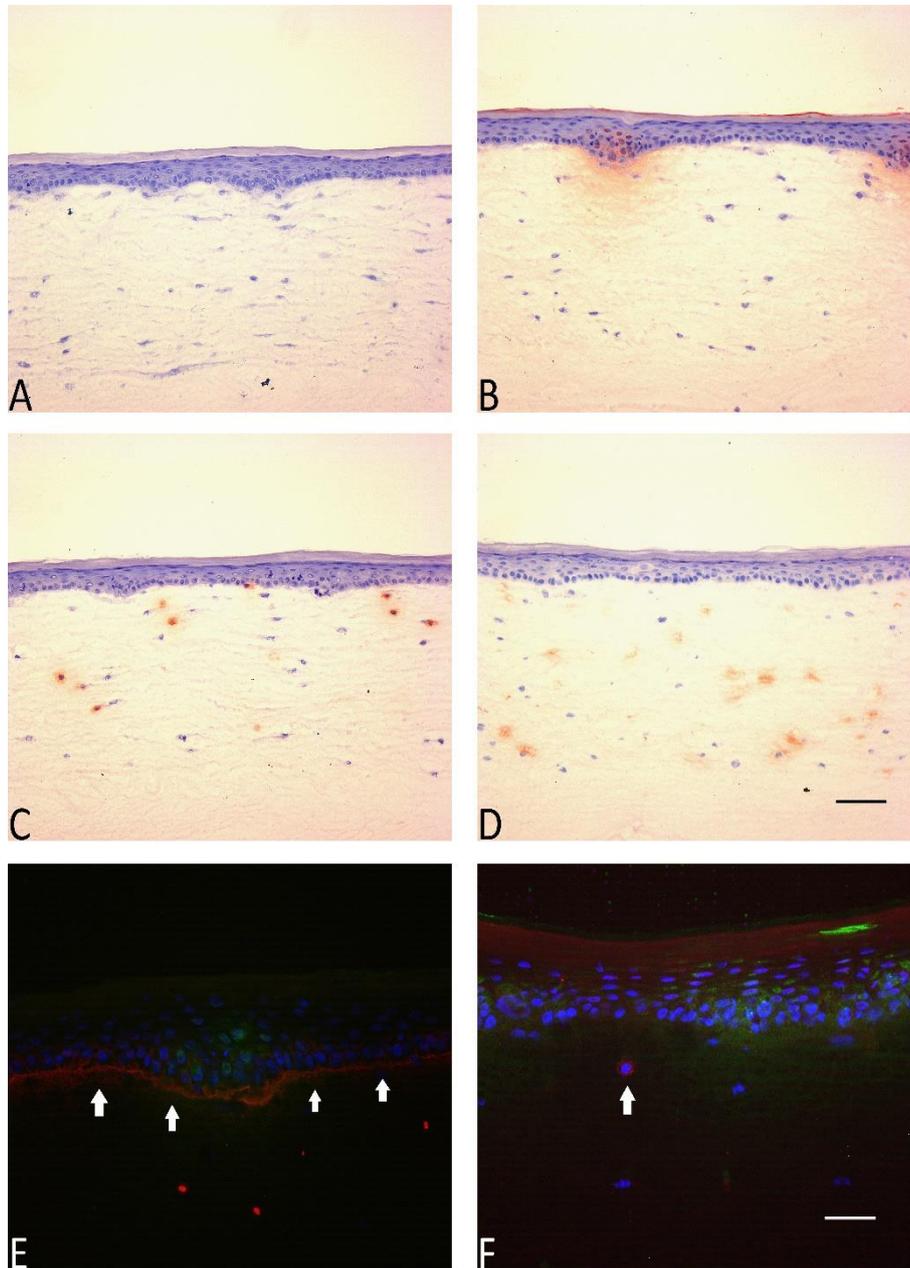


Abbildung 11: Integration der Mastzellen und Plattenepithelkarzinom (PEK)-Zellen (SCC13) in die organotypische Kultur der Haut. Hämatoxylin-Färbung (lila, A). Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen GFP (rot, B), Tryptase (rot, C) bzw. Chymase (rot, D). Immunfluoreszenzfärbung mittels Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper (rot) mit Antikörpern gegen Integrin β 4 (E) bzw. c-kit (F); GFP-positive SCC13-Zellen (grün) und DAPI-gefärbte Zellkerne (blau). Maßstab: 100 μ m (A–D) bzw. 50 μ m (E–F).

4.2 Einfluss der Mastzellen auf das Plattenepithelkarzinom in der organotypischen Kultur der Haut

Zur Evaluation des Einflusses der Mastzellen auf SCC12- bzw. SCC13-Zellen wurde die bereits in Kapitel 4.1.4 etablierte organotypische Kultur mit integrierten Mastzellen und SCC12- bzw. SCC13-Zellen genutzt. Zum Vergleich wurde auch eine organotypische Kultur der Haut ohne Mastzellen hergestellt. Die Kulturen wurden 8 Tage nach dem Air-Lifting für weitere histologische Untersuchungen bearbeitet.

4.2.1 Einfluss der Mastzellen auf SCC12 in der organotypischen Kultur der Haut

Um den Einfluss der Mastzellen auf SCC12-Zellen zu untersuchen, wurde die bereits etablierte Methode mit SCC12 aus Kapitel 4.1.4 genutzt. Als Kontrolle diente eine organotypische Kultur ohne Mastzellen.

In beiden Kulturen fand sich eine sehr geringe Anzahl GFP-positiver Zellen im gesamten Bereich (< 5 Zellen), sodass keine suffiziente statistische Bewertung möglich war. Morphologisch zeigten die Kulturen keine erkennbaren Unterschiede (vergleiche Abbildung 10C, organotypische Kultur mit Mastzellen und SCC12).

4.2.2 Einfluss der Mastzellen auf SCC13 in der organotypischen Kultur der Haut

Um den Einfluss der Mastzellen auf SCC13-Zellen zu untersuchen, wurde die bereits etablierte Methode mit SCC13 aus Kapitel 4.1.4 genutzt. Als Kontrolle diente eine organotypische Kultur ohne Mastzellen.

In beiden Kulturen fanden sich 12–18 Kolonien mit GFP-positiven Zellen (Abbildung 12). Auch hier zeigten die Kulturen keine erkennbaren morphologischen Unterschiede (vergleiche Abbildung 11B, organotypische Kultur mit Mastzellen und SCC13).

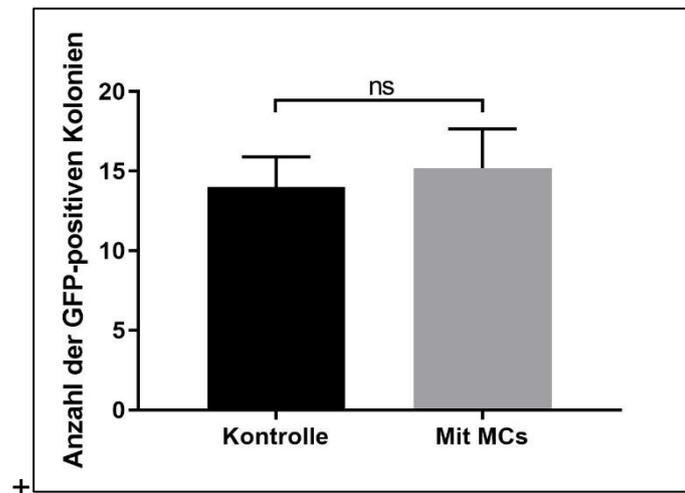


Abbildung 12: Anzahl der GFP-positiven SCC13-Kolonien in der organotypischen Kultur ohne bzw. mit Mastzellen. Es wurde die Anzahl im gesamten Schnitt bestimmt; n = 6, 14,00 ± 1,89 vs. 15,17 ± 2,48, ns: nicht signifikant, p > 0,05.

4.3 Einfluss von (aktivierten) Mastzellen auf SCC-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms der Haut

Im vorherigen Unterkapitel wurde der Einfluss der Mastzellen auf das PEK in der organotypischen Kultur der Haut untersucht. Da keine Effekte von Mastzellen auf SCC-Zellen erkennbar waren, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um den Einfluss von Mastzellen auf SCC-Zellen zu prüfen, in diesem Fall jedoch mit der in Kapitel 4.1.2 etablierten Kultur, welche nur mit SCC12- bzw. SCC13-Zellen epithelisiert wurde (ohne Keratinozyten). Um die Wirkung einer Mastzellaktivierung zu untersuchen, wurden Antikörper gegen FcεRI (29C6) 2 sowie 6 Tage nach dem Air-Lifting zugegeben. Die Kulturen wurden 8 Tage nach dem Air-Lifting für weitere histologische Untersuchungen bearbeitet.

4.3.1 Einfluss der Mastzellen auf SCC12 in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms

Eine Färbung mit Hämatoxylin ergab in allen organotypischen Kulturen mit SCC12-Zellen (ohne Mastzellen, mit Mastzellen und mit Mastzellenaktivierung) ein vergleichbares morphologisches Ergebnis (Abbildung 13). Die Entwicklung der epidermalen Struktur war nahezu identisch und die einzelnen SCC12-Zellen zeigten hinsichtlich ihrer Morphologie keine erkennbaren Unterschiede. In einer weiteren immunhistochemischen

Untersuchung mit Antikörpern gegen β -Catenin bzw. Integrin $\beta 4$ konnten ebenfalls keine sichtbaren Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 13D–I).

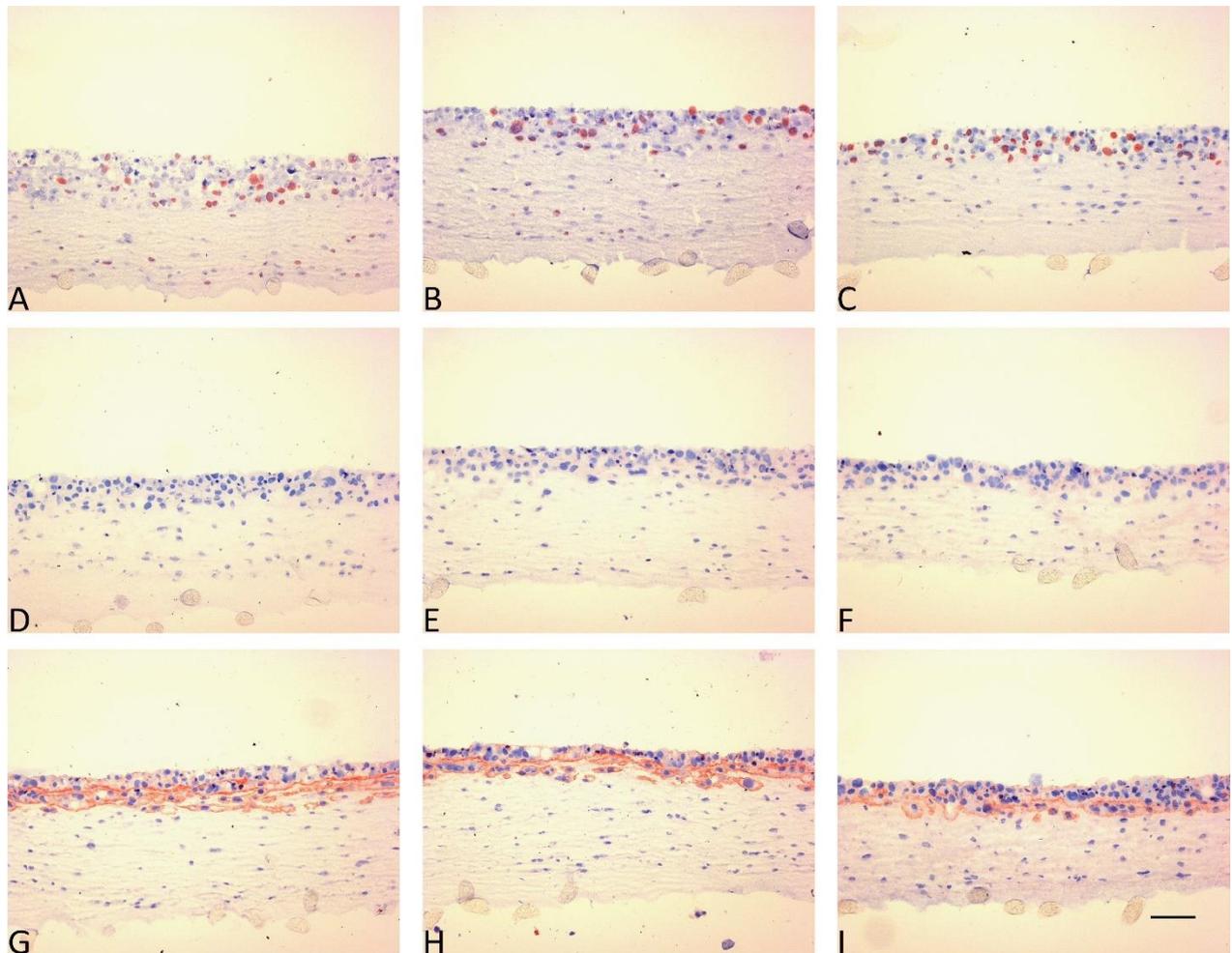


Abbildung 13: Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne Mastzellen (A, D und G), mit Mastzellen (B, E und H) und bei einer Mastzellenaktivierung (C, F und I). Immunhistochemische Färbung (rot) mit Antikörpern gegen BrdU (A–C), β -Catenin (D–F) bzw. Integrin $\beta 4$ (G–I). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

Zur Evaluation der Proliferation wurde dem Medium 48 h vor dem Ende der Kultur BrdU zugegeben und eine immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen BrdU durchgeführt (Abbildung 13A–C). Eine Quantifizierung der Anzahl der BrdU-positiven SCC12-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kulturen (Abbildung 14).

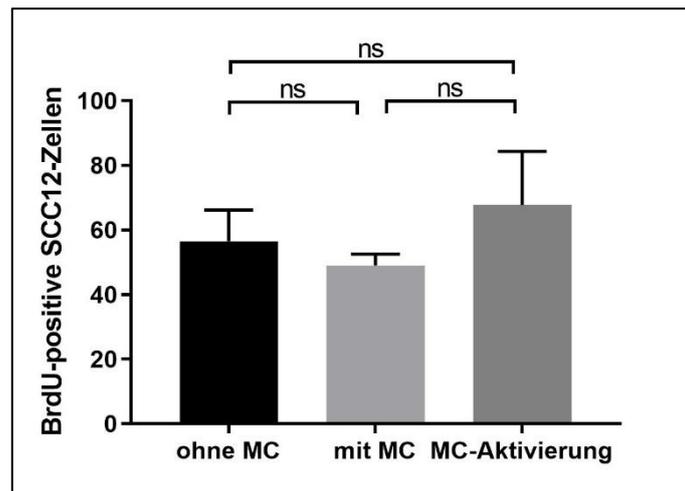


Abbildung 14: Anzahl der BrdU-positiven SCC12-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne Mastzellen, mit Mastzellen und mit Mastzellenaktivierung. Zufällig ausgewählte mikroskopisch aufgenommene Schnittbilder (872 × 691 µm), ohne Mastzellen (MC, Kontrolle), mit MC und mit MC-Aktivierung; n = 8, 56,50 ± 11,79 vs. 49,00 ± 3,61 vs. 67,75 ± 20,40, ns: nicht signifikant, p > 0,05.

4.3.2 Einfluss von (aktivierten) Mastzellen auf SCC13-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms

Auch in allen drei organotypischen Kulturen mit SCC13-Zellen (ohne Mastzellen, mit Mastzellen und mit Mastzellenaktivierung) ergab sich eine vergleichbare Morphologie (Abbildung 15). Die Entwicklung der epidermalen Struktur zeigte keine Unterschiede. Ebenso waren in einer weiteren immunhistochemischen Untersuchung mit Antikörpern gegen β-Catenin bzw. Integrin β4 keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 15D–I).

Zur Evaluation der Proliferation wurde nach einem 48-stündigen BrdU-Einbau eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt (Abbildung 15A–C). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kulturen (Abbildung 16).

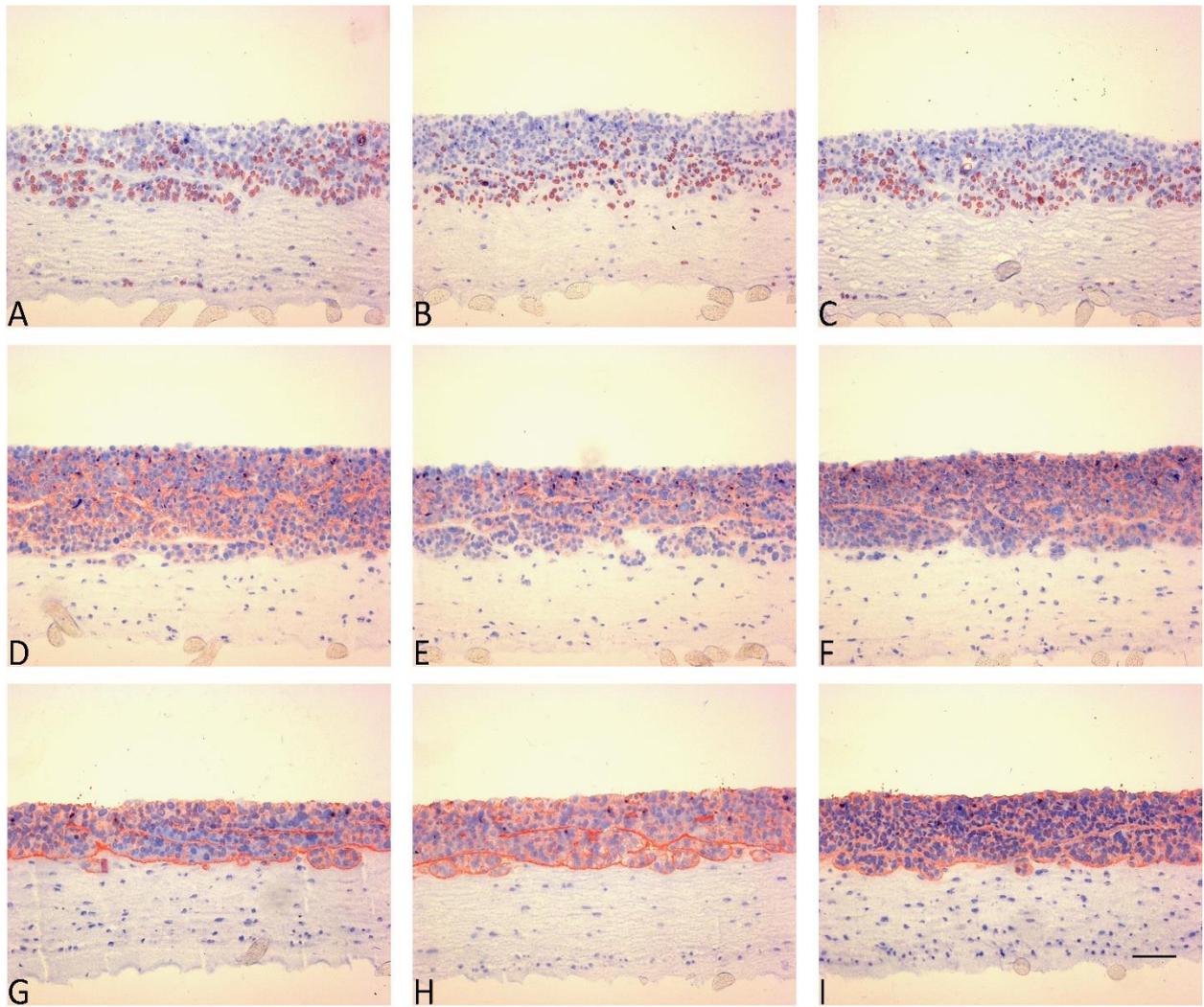


Abbildung 15: Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne Mastzellen (A, D und G), mit Mastzellen (B, E und H) und mit Mastzellenaktivierung (C, F und I). Immunhistochemische Färbung (rot) mit Antikörpern gegen BrdU (A–C), β -Catenin (D–F) bzw. Integrin β 4 (G–I). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

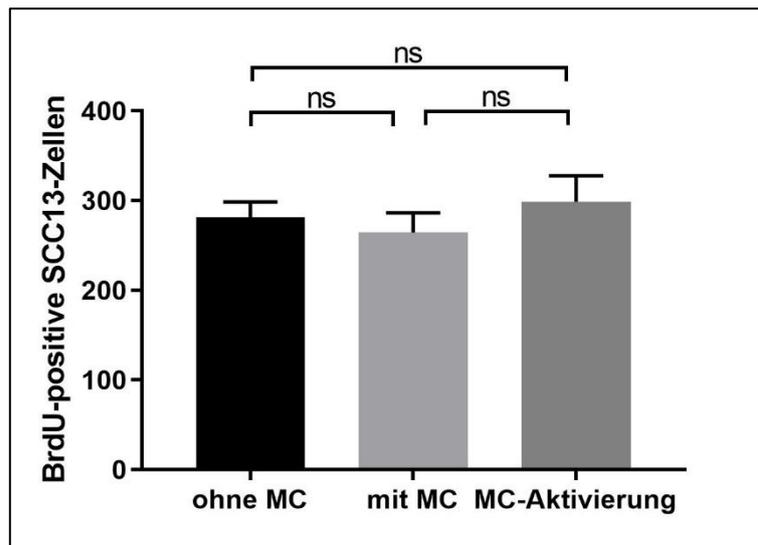


Abbildung 16: Anzahl der BrdU-positiven SCC13-Zellen in der organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne Mastzellen, mit Mastzellen und mit Mastzellenaktivierung. Zufällig ausgewählte mikroskopisch aufgenommene Schnittbilder (872 × 691 µm), ohne Mastzellen (MC, Kontrolle), mit MC und mit MC-Aktivierung; n = 4, 281,25 ± 17,21 vs. 264,50 ± 21,95 vs. 298,75 ± 29,03, ns: nicht signifikant, p > 0,05.

4.4 Wirkungen von Histamin auf das Plattenepithelkarzinom der Haut in der organotypischen Kultur

Im vorherigen Unterkapitel wurde der Einfluss der Mastzellen sowie der Mastzellenaktivierung auf SCC12- bzw. SCC13-Zellen in der in Kapitel 4.1.3 etablierten organotypischen Kultur untersucht. Da die Mastzellen unter den gegebenen Bedingungen keine erkennbaren Effekte auf die PEK-Zellen zeigten (siehe Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3), wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Wirkung des Mastzellenmediators Histamin zu analysieren.

Zur Analyse des Einflusses von Histamin auf das PEK der Haut wurde die organotypische Kultur aus Kapitel 4.1.2 verwendet, die mit SCC12- bzw. SCC13-Zellen epithelisiert wurde (ohne Keratinozyten/Mastzellen). Das Histamin (Endkonzentration: 1×10^{-5} M) wurde dem Medium jeweils 2 und 6 Tage nach dem Air-Lifting zugegeben. Am 8. Tag nach dem Air-Lifting wurde die organotypische Kultur beendet.

4.4.1 Wirkungen von Histamin auf SCC12 in der organotypischen Kultur

Eine Färbung mit Hämatoxylin ergab in den beiden organotypischen Kulturen mit SCC12-Zellen (ohne bzw. mit Histamin) eine vergleichbare Morphologie (Abbildung 19). Die

Entwicklung der epidermalen Schicht war nahezu identisch und die Morphologie der einzelnen SCC12-Zellen zeigte keine erkennbaren Unterschiede (Abbildung 19).

Zur Evaluation der Proliferation wurde dem Medium 48 h vor dem Ende der Kultur BrdU zugegeben und nach Herstellung der histologischen Schnitte eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt. Es zeigte sich in der organotypischen Kultur mit Histamin eine signifikant reduzierte Anzahl BrdU-positiver SCC12-Zellen (ca. -30%) (Abbildung 17).

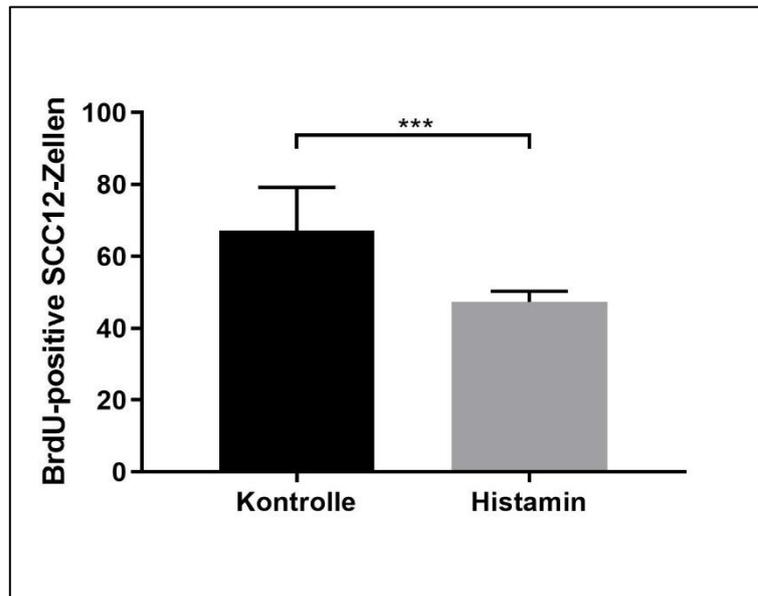


Abbildung 17: Anzahl der BrdU-positiven SCC12-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Histamin. Es zeigte sich eine um ca. 30% reduzierte Anzahl BrdU-positiver SCC12-Zellen nach der Histamin-Gabe. Zufällig ausgewählte mikroskopisch aufgenommene Schnittbilder (872 × 691 µm), ohne bzw. mit Histamin; n = 7. 67,14 ± 12,08 vs. 47,29 ± 3,04, *** p < 0,001.

Die signifikante Reduktion der Proliferation nach Inkubation mit Histamin konnte in einer immunhistochemischen Untersuchung mit Antikörpern gegen Ki-67 bestätigt werden (Abbildung 18 und Abbildung 19A–B).

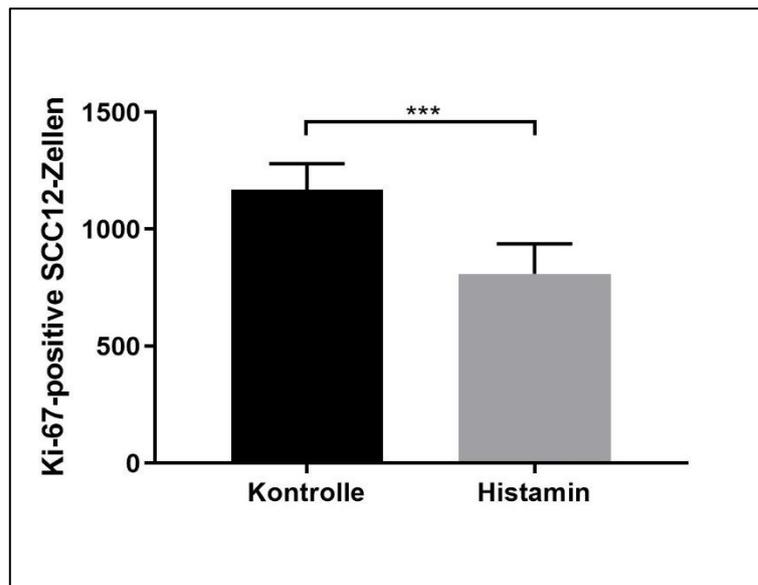


Abbildung 18: Anzahl der Ki-67-positiven SCC12-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Histamin. Es zeigte sich eine um ca. 30% reduzierte Anzahl Ki-67-positiver SCC12-Zellen nach der Histamin-Gabe. Es wurde die Anzahl im gesamten Schnitt bestimmt; n = 9. 1169,00 ± 111,31 vs. 809,70 ± 128,74, *** p < 0,001.

Um die möglichen Signalwege von Histamin in den SCC12-Zellen zu untersuchen, wurden weitere immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen β -Catenin, Integrin β 4 bzw. VEGFR2 durchgeführt. Die β -Catenin und Integrin β 4 Expression veränderte sich durch Histamin nicht (Abbildung 19C–F).

Studien belegen, dass der VEGF/VEGFR2-Signalweg das Tumorstadium und die Tumorerkrankung begünstigt (siehe Kapitel 1.3.3). In der vorliegenden Arbeit waren die meisten SCC12-Zellen in den Kulturen ohne Histamin VEGFR2-positiv (Abbildung 19C). Nach der Inkubation mit Histamin exprimierten die SCC12-Zellen kein VEGFR2 mehr (Abbildung 19D).

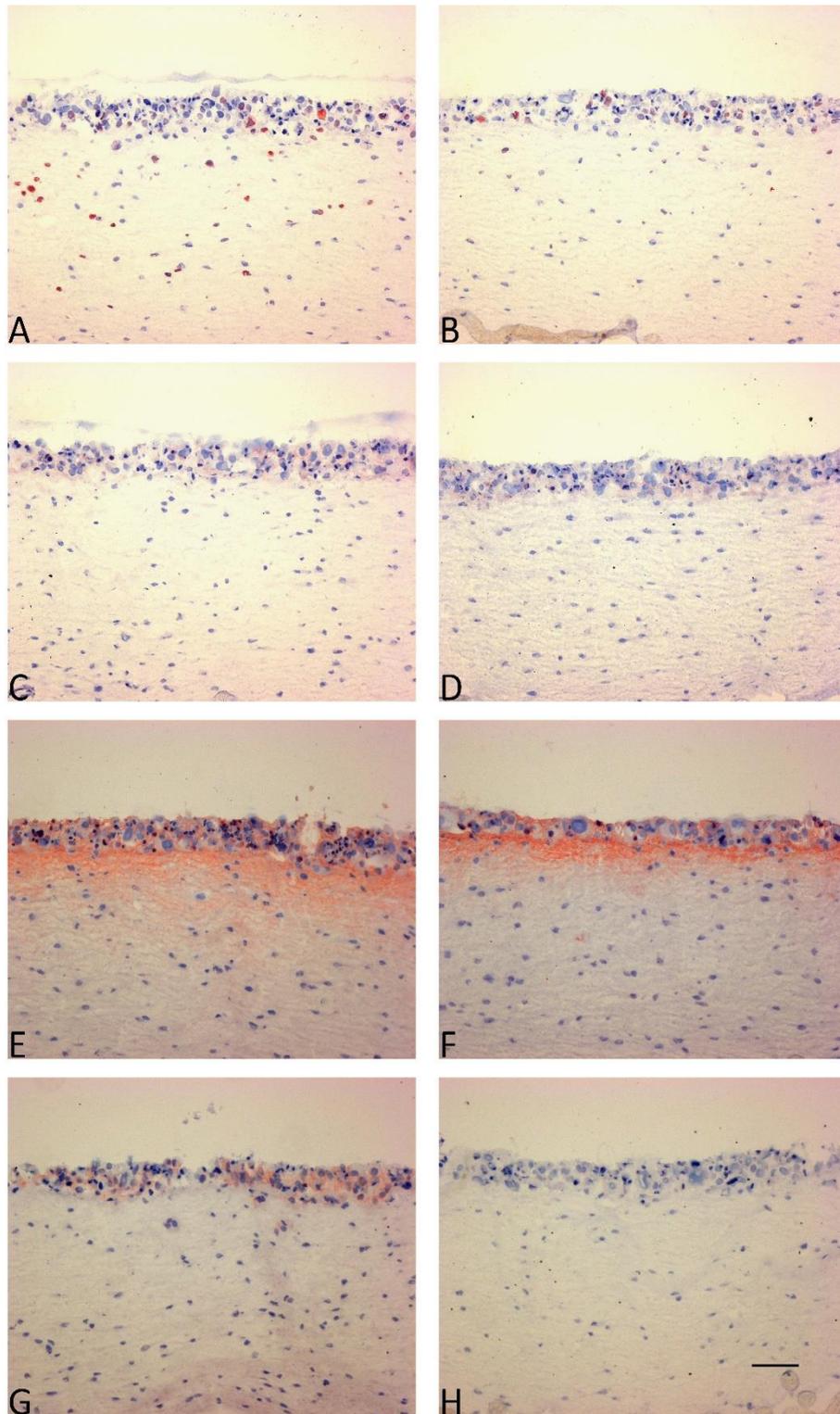


Abbildung 19: Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Histamin. Kontrolle (A, C, E und F) und mit Histamin (B, D, F und H). Immunhistochemische Färbung (ACE, rot) mit Antikörpern gegen Ki-67 (A und B), β -Catenin (C und D), Integrin β 4 (E und F) bzw. VEGFR2 (G und H). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

4.4.2 Wirkungen von Histamin auf SCC13 in der organotypischen Kultur

Eine Färbung mit Hämatoxylin ergab in beiden organotypischen Kulturen mit SCC13-Zellen (ohne bzw. mit Histamin) keine sichtbaren Unterschiede in der Morphologie (Abbildung 22). Die Entwicklung der epidermalen Schicht war nahezu identisch und auch hinsichtlich der Morphologie der einzelnen SCC13-Zellen waren keine Unterschiede erkennbar.

Zur Evaluation der Proliferation wurde dem Medium 48 h vor dem Ende der Kultur BrdU zugegeben und nach Herstellung der histologischen Schnitte eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt. Es zeigte sich in der organotypischen Kultur mit Histamin eine um ca. 60 % signifikant reduzierte Anzahl BrdU-positiver SCC13-Zellen (Abbildung 20).

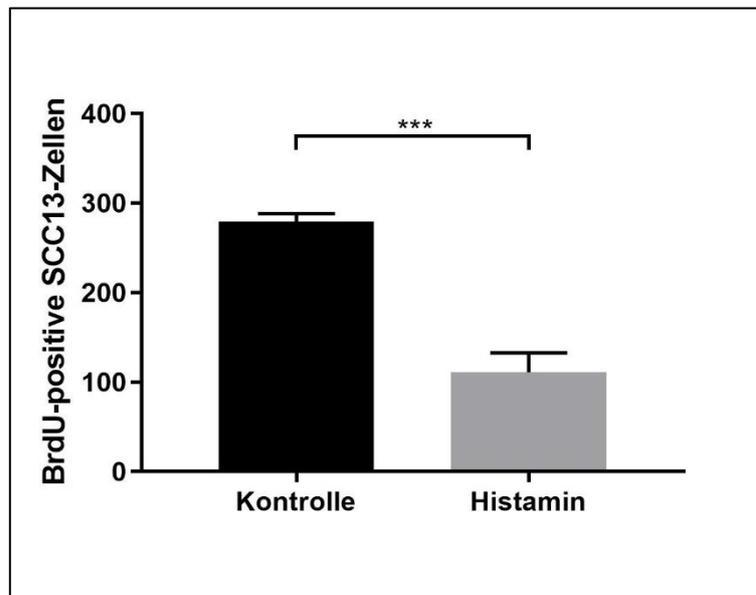


Abbildung 20: Anzahl der BrdU-positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Histamin. Es zeigte sich eine um ca. 60% reduzierte Anzahl BrdU-positiver SCC13-Zellen nach der Histamin-Gabe. Zufällig ausgewählte mikroskopisch aufgenommene Schnittbilder (872 × 691 µm), ohne bzw. mit Histamin; n = 7, 279,00 ± 9,07 vs. 111,28 ± 21,42, *** p < 0,001.

Die Proliferation wurde weiter untersucht, indem eine immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen Ki-67 durchgeführt wurde. Nach Inkubation mit Histamin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Ki-67-positiven SCC13-Zellen um ca. 25 % (Abbildung 21 und Abbildung 22A–B).

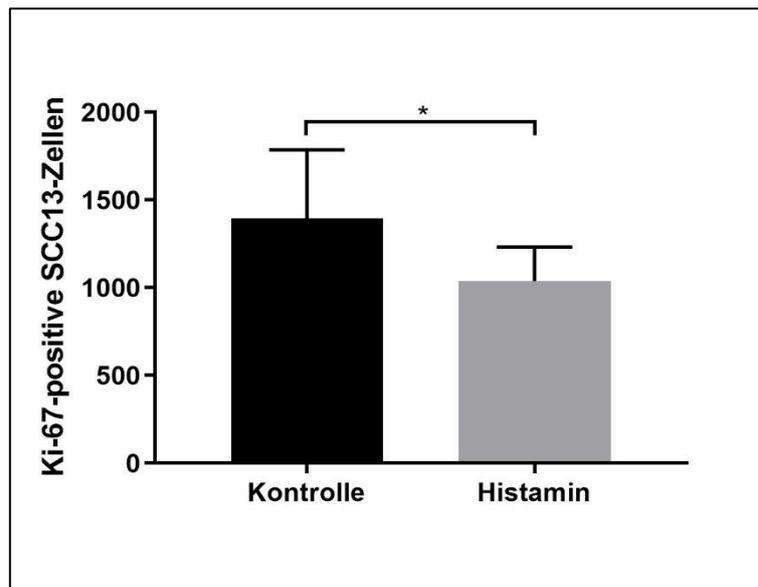


Abbildung 21: Anzahl der Ki-67-positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Histamin. Es zeigte sich eine um ca. 25% reduzierte Anzahl Ki-67-positiver SCC13-Zellen nach der Histamin-Gabe. Es wurde die Anzahl im gesamten Schnitt bestimmt; n = 9, 1395,67 ± 310,51 vs. 1037,44 ± 139,77, * p < 0,05.

Um mögliche Signalwege von Histamin in SCC13-Zellen zu untersuchen, wurden weitere immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen β -Catenin, Integrin β 4 bzw. VEGFR2 durchgeführt. Die Expression von β -Catenin und Integrin β 4 zeigte nach der Histamin-Gabe keine Veränderung. Die meisten Zellen waren VEGFR2-positiv (Abbildung 22C). Der Anteil der VEGFR2-positiven SCC13-Zellen nahm unter Histamin-Inkubation deutlich ab (Abbildung 22D). Dieser Effekt war in den basalen Zellschichten besonders deutlich.

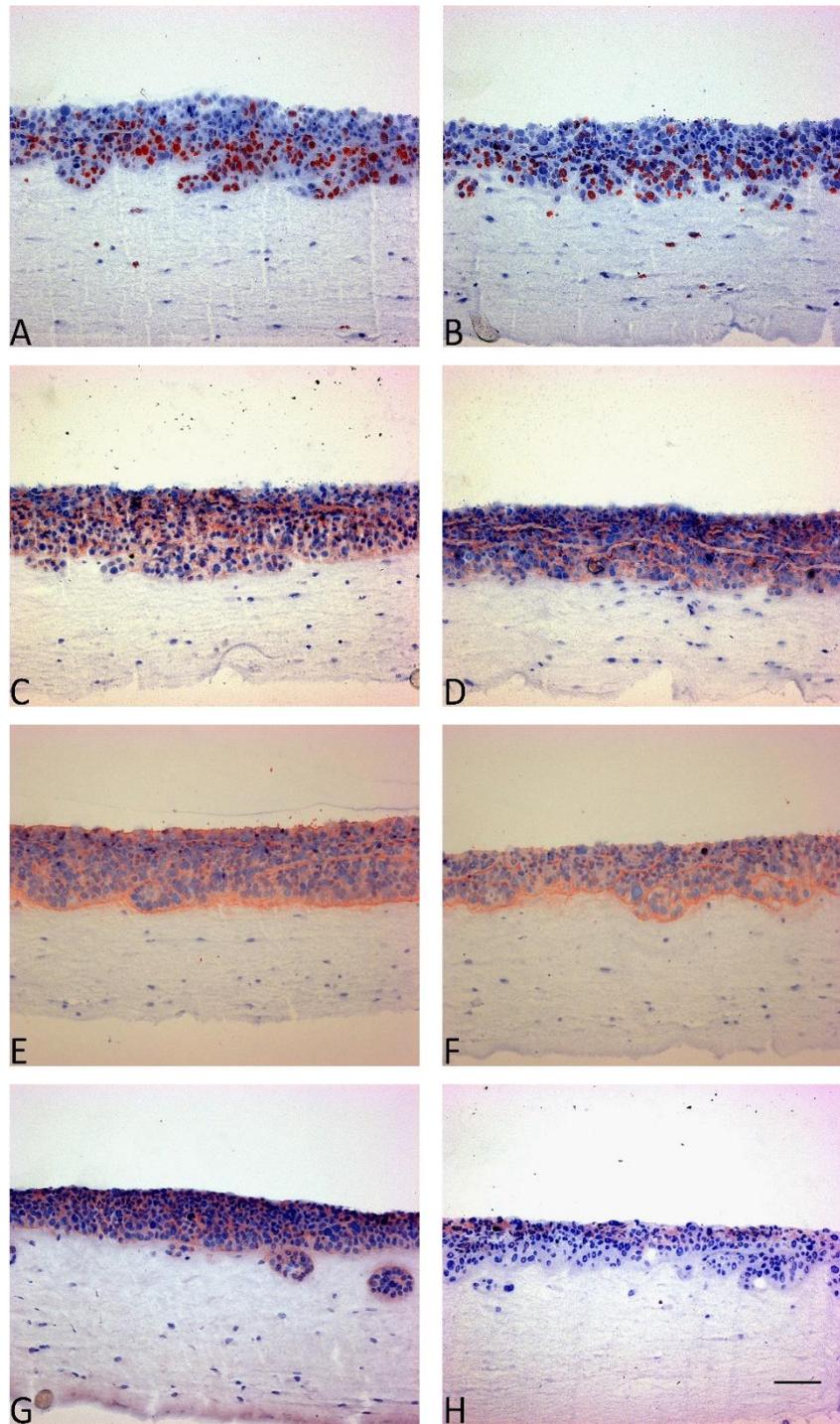


Abbildung 22: Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Histamin. Kontrolle (A, C, E und F) und mit Histamin (B, D, F und H). Immunhistochemische Färbung (ACE, rot) mit Antikörpern gegen Ki-67 (A und B), β -Catenin (C und D), Integrin β 4 (E und F) bzw. VEGFR2 (G und H). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

4.4.3 Wirkungen von Histamin auf SCC12 und SCC13 in der Monokultur

Um Verhaltensunterschiede der Tumorzellen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen zu untersuchen, wurde der Effekt von Histamin auf Monokulturen mit SCC12- bzw. SCC13-Zellen untersucht (siehe Kapitel 3.4). 50 000 Zellen wurden eingesät. Alle 2 Tage wurde das Medium erneuert und Histamin (Endkonzentration: 10^{-5} M) zugegeben. Nach 6 Tagen zeigte sich in den beiden Zelllinien keine signifikant unterschiedliche Zellzahl in den Ansätzen mit und ohne Histamin (Abbildung 23 und Abbildung 24).

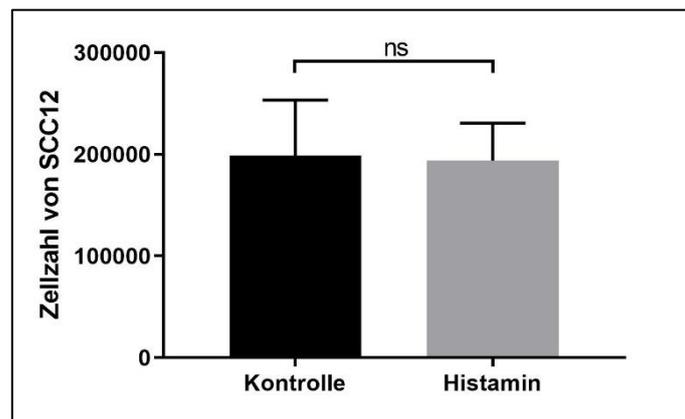


Abbildung 23: Anzahl der SCC12-Zellen mit bzw. ohne Histamin 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen; n = 6, $198\,817 \pm 54\,489$ vs. $193\,917 \pm 36\,678$, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

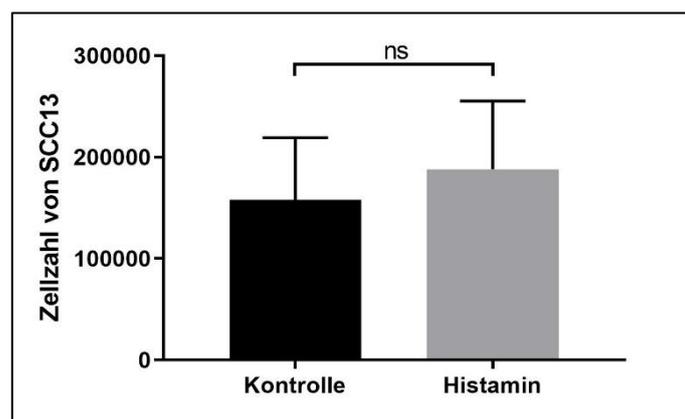


Abbildung 24: Anzahl der SCC13-Zellen mit bzw. ohne Histamin 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen; n = 6, $157\,783 \pm 61\,433$ vs. $188\,217 \pm 67\,115$, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

4.5 Wirkungen von Compound 21 auf das Plattenepithelkarzinom

Um eine Anwendungsmöglichkeit der organotypischen Kultur zu demonstrieren, wurden die Effekte des AT2R-Agonisten C21 auf SCC12- und SCC13-Zellen in der etablierten organotypischen Kultur untersucht. Fokussiert wurde sich hierbei auf die Proliferation sowie die Apoptose.

4.5.1 Expression von AT2R in SCC12 und SCC13

In der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung mit Antikörpern gegen AT2R zeigten sowohl SCC12- als auch SCC13-Zellen ein positives Signal (Abbildung 25).

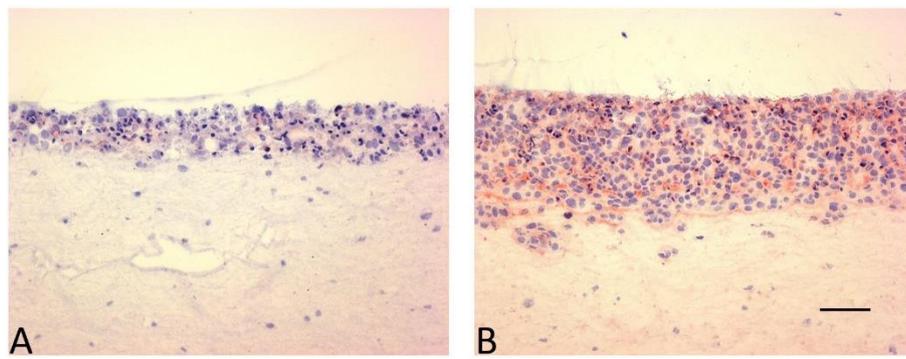


Abbildung 25: Immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen AT2R in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12 und SCC13). Sowohl SCC12- (A) als auch SCC13-Zellen (B) exprimierten AT2R (rote Signale). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 µm.

4.5.2 Wirkungen von Compound 21 auf SCC12 in der organotypischen Kultur

Zur Evaluation der C21-Wirkung auf SCC12-Zellen wurde das Dermisäquivalent wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben hergestellt und ausschließlich mit SCC12-Zellen epithelisiert. C21 wurde ab dem Zeitpunkt des Air-Liftings dreimal bei jedem Mediumwechsel dem Medium zugegeben. Die Endkonzentration von C21 lag bei 1×10^{-6} M.

In der Kultur mit C21 bildeten SCC12-Zellen eine dünnere Epithelzellschicht aus (Abbildung 26). Sowohl in der Kontrolle als auch in der Kultur mit C21 entwickelte sich die epidermale Struktur nicht optimal. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 erwähnt, kam es hier z.B. zu einer Kondensation der Zellkerne, was möglicherweise auf eine Apoptose hindeutet [198].

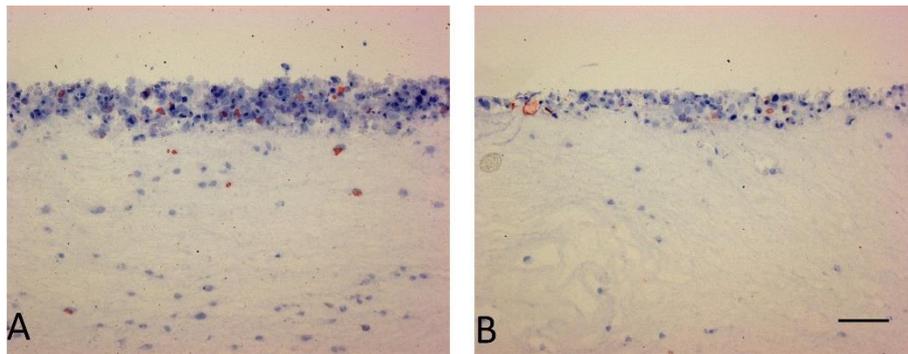


Abbildung 26: Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne (A) bzw. mit C21-Gabe (B). Immunhistochemie mit Antikörpern gegen BrdU nach einem 48-stündigen Einbau (rote Signale). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab 100 µm.

Mit der TUNEL-Färbung wurde die Apoptose in beiden Kulturen (ohne sowie mit C21) bestätigt (Abbildung 27). In beiden Ansätzen war die Anzahl der apoptotischen SCC12-Zellen hoch. Die Anzahl der TUNEL-positiven SCC12-Zellen war nicht signifikant verschieden ($14,00 \pm 2,00$ vs. $15,67 \pm 1,53$, $p > 0,05$; bestimmt mit drei zufällig ausgewählten mikroskopisch aufgenommenen Schnittbildern von ca. $435 \times 345 \mu\text{m}$).

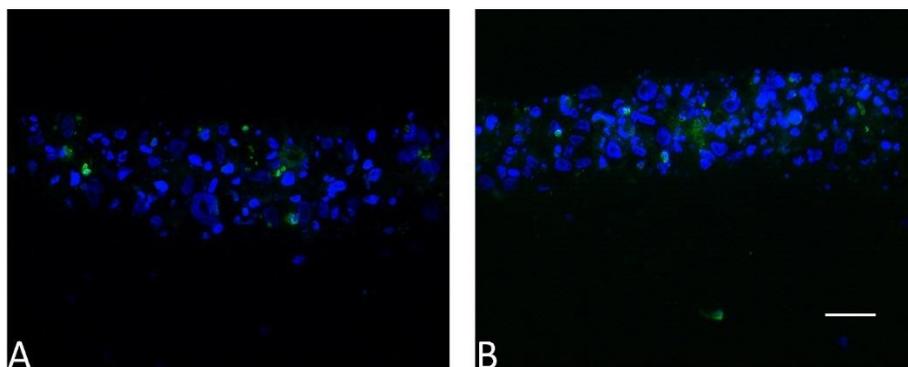


Abbildung 27: TUNEL Färbung (grün) in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit C21. Kontrolle (A) und mit C21 (B). DAPI-gefärbte Zellkerne (blau). Maßstab: 50 µm.

Zur Evaluation der Proliferation wurde die Anzahl BrdU-positiver Zellen in einem gesamten Schnitt bestimmt. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen reduzierte sich nach der C21-Gabe signifikant um ca. 40%. Dieser Effekt wurde durch Zugabe des AT2R-Antagonisten PD123319 2 h vor der C21-Gabe aufgehoben (Abbildung 28).

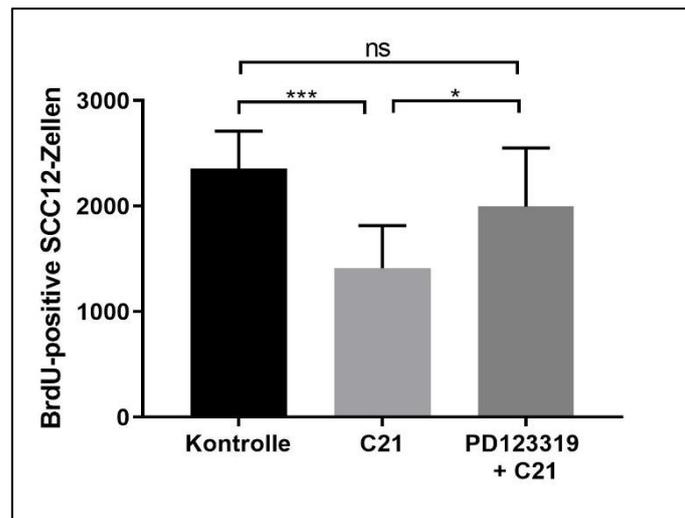


Abbildung 28: Anzahl der BrdU-positiven SCC12-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC12) ohne bzw. mit Compound 21. Es zeigte sich eine um ca. 40% reduzierte Anzahl BrdU-positiver SCC12-Zellen nach der Zugabe von C21. Dieser Effekt wurde durch den AT2R-Antagonisten PD123319 (Zugabe 2 h vor C21-Zugabe) aufgehoben. Es wurde die Anzahl im gesamten Schnitt bestimmt; $n = 9$, 2359 ± 117 vs. 1412 ± 134 vs. 1997 ± 184 . * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

4.5.3 Wirkungen von Compound 21 auf SCC13 in der organotypischen Kultur

Zur Evaluation der Effekte von C21 auf SCC13-Zellen wurden organotypische Kulturen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben hergestellt und das Dermisäquivalent mit SCC13 epithelisiert. Das C21 wurde ab dem Zeitpunkt des Air-Liftings alle 2 Tage dem Medium zugegeben. Die Endkonzentration von C21 betrug 1×10^{-6} M.

Unter dem Einfluss von C21 bildeten die SCC13-Zellen eine etwas dünnere Struktur aus als Zellen ohne C21. Ansonsten waren in den beiden Kulturen keine deutlichen morphologischen Unterschiede sichtbar. Um die Proliferation zu quantifizieren, erfolgte ein 48-stündiger BrdU-Einbau mit anschließender immunhistochemischer Detektion (Abbildung 29).

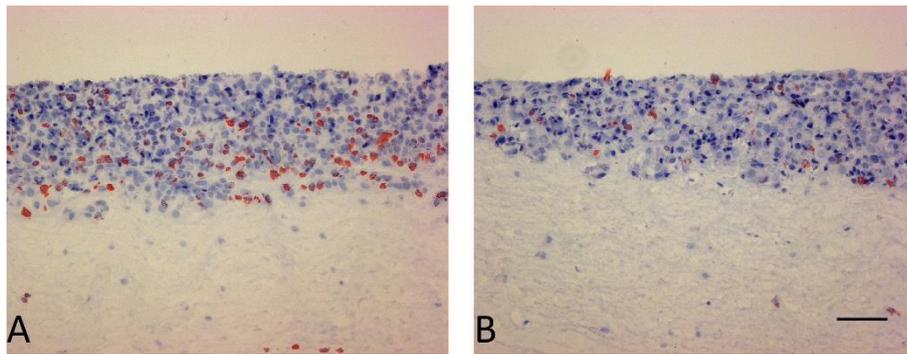


Abbildung 29: Organotypische Kultur des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne (A) sowie mit (B) C21-Gabe. Immunhistochemie mit Antikörpern gegen BrdU nach einem 48-stündigen Einbau (rote Signale). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 100 μ m.

Die Anzahl BrdU-positiver Zellen reduzierte sich nach der C21-Gabe signifikant um ca. 55 % (Abbildung 30). Dieser Effekt wurde durch Zugabe des AT2R-Antagonisten PD123319 2 h vor der C21-Gabe aufgehoben.

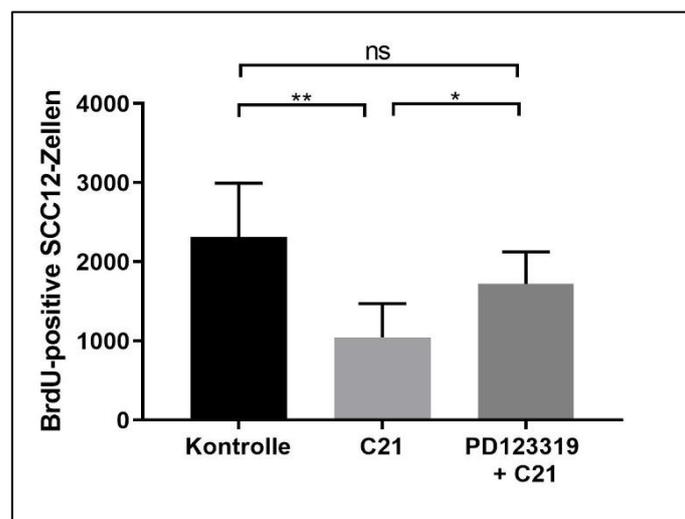


Abbildung 30: Anzahl der BrdU-positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit C21. Es zeigte sich eine um ca. 40 % reduzierte Anzahl BrdU-positiver SCC13-Zellen nach der Zugabe von C21. Dieser Effekt wurde durch den AT2R-Antagonisten PD123319 (Zugabe 2 h vor C21-Zugabe) aufgehoben. Es wurde die Anzahl im gesamten Schnitt bestimmt; $n = 5$, 2315 ± 304 vs. 1046 ± 190 vs. 1721 ± 179 . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

Bei der TUNEL-Untersuchung zeigten nach der C21-Gabe deutlich mehr SCC13-Zellen ein positives Signal (Abbildung 31). Dieser Unterschied war signifikant (Abbildung 32).

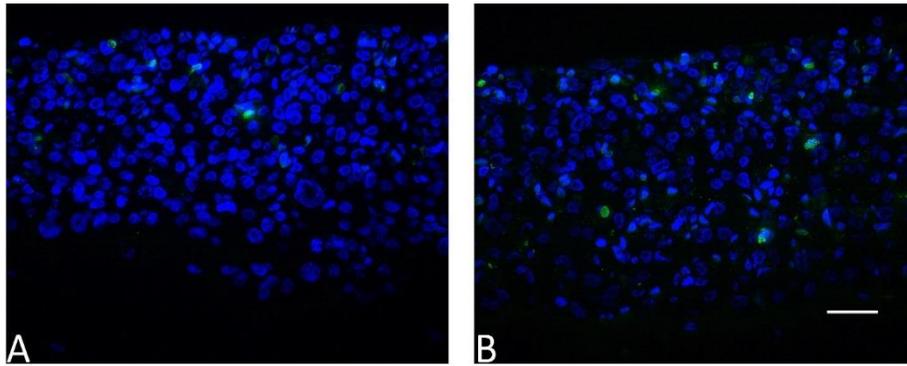


Abbildung 31: TUNEL Färbung (grün) in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne (A) und mit C21 (B). DAPI-gefärbte Zellkerne (blau). Maßstab: 50 μm .

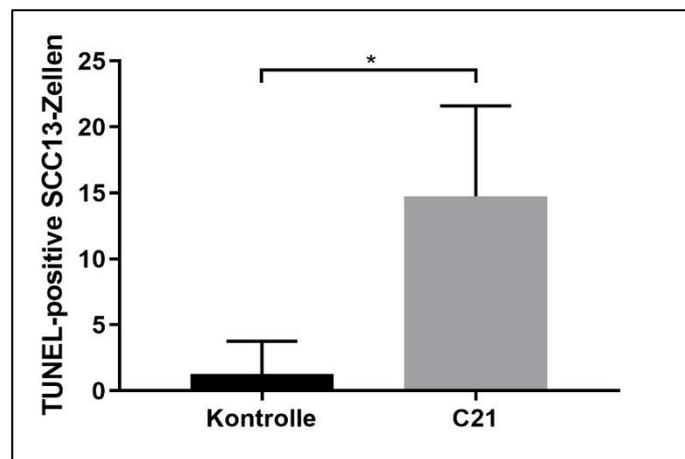


Abbildung 32: Anzahl der TUNEL-positiven SCC13-Zellen in organotypischen Kulturen des Plattenepithelkarzinoms (SCC13) ohne bzw. mit Compound 21. Zufällig ausgewählte mikroskopisch aufgenommene Schnittbilder ($436 \times 345 \mu\text{m}$); $n = 4$, $1,25 \pm 1,25$ vs. $14,75 \pm 3,42$, * $p < 0,05$.

4.5.4 Wirkungen von C21 auf SCC12 und SCC13 in der Monokultur

Um Verhaltensunterschiede der Tumorzellen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen zu prüfen, wurden Monokulturen mit SCC12- bzw. SCC13-Zellen mit C21 inkubiert (siehe Kapitel 3.4). 50 000 Zellen wurden eingesät. Alle 2 Tage wurde das Medium inklusive das C21 (Endkonzentration: 10^{-6} M) erneuert. Nach 6 Tagen zeigte sich bei beiden Zelllinien keine signifikant unterschiedliche Zellzahl in den Kulturen mit und ohne C21 (Abbildung 33 und Abbildung 34).

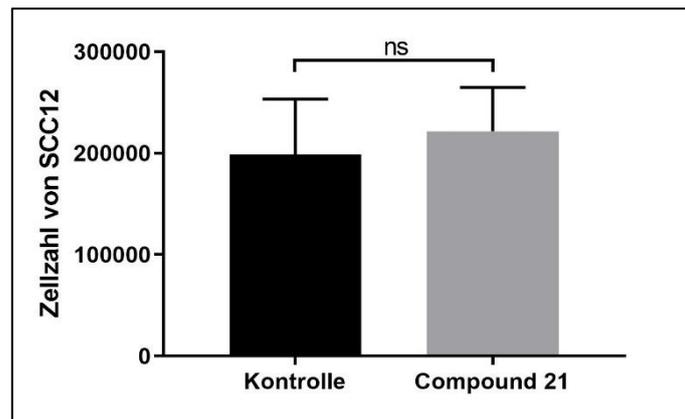


Abbildung 33: Anzahl der SCC12-Zellen in der Monokultur ohne bzw. mit C21 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen; n = 6, 198 817 ± 54 489 vs. 221 600 ± 43 361, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

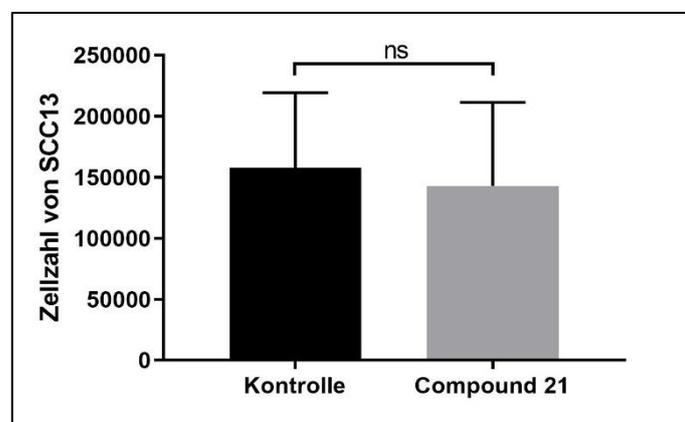


Abbildung 34: Anzahl der SCC13-Zellen in der Monokultur ohne bzw. mit C21 6 Tage nach Einsaat von 50 000 Zellen; n = 6, 157 783 ± 61 433 vs. 143 117 ± 68 317, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

4.6 Wirkungen von Compound 21 auf die Keratinozyten

Um eine weitere Anwendungsmöglichkeit der organotypischen Kultur zu demonstrieren, wurde die Wirkung des AT2R-Agonisten C21 auf die Keratinozyten in der etablierten organotypischen Kultur untersucht. Fokussiert wurde sich hierbei auf die Proliferation sowie die Apoptose.

Für immunhistologische Untersuchungen wurde der wie oben beschrieben hergestellten organotypischen Kultur ab dem Zeitpunkt des Air-Liftings alle 2 Tage bei jedem Mediumwechsel C21 zugegeben (Endkonzentration: 1×10^{-6} M bzw. 1×10^{-7} M). Gegebenenfalls wurde 2 h vor der C21-Gabe der AT2R-Antagonist PD123319 zugefügt. Zur Untersuchung der Proliferation erfolgte ein 48-stündiger BrdU-Einbau.

4.6.1 Wirkungen von Compound 21 auf die Keratinozyten in der organotypischen Kultur

Die C21-Gabe führte zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen morphologischen Veränderung der Keratinozyten. Die Keratinozyten entwickelten eine dünnere epidermale Struktur, welche auf eine reduzierte Proliferation hindeutet (Abbildung 35A–C). Bei der höheren C21-Konzentration von 1×10^{-6} M trat zudem teils eine Kondensation der Zellkerne auf, was als Anzeichen einer Apoptose gedeutet werden kann [198].

Zur Evaluation des Differenzierungszustandes der Keratinozyten wurde die Expression von CK10 und Transglutaminase in An- und Abwesenheit von C21 immunhistochemisch untersucht (Abbildung 35D–I). Trotz des reduzierten Wachstums bei der C21-Inkubation exprimierten die beide Differenzierungsmarker.

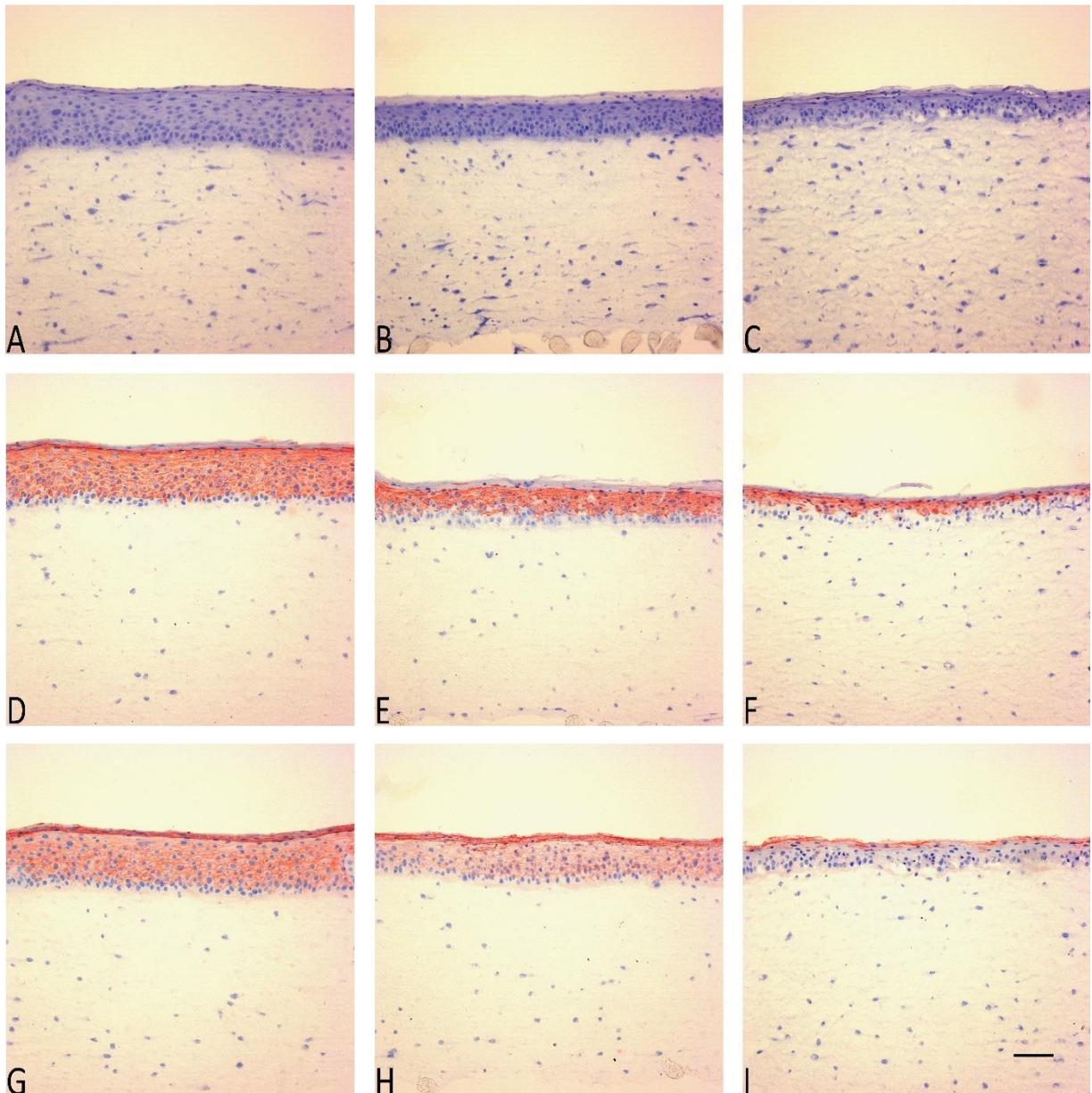


Abbildung 35: Organotypische Kultur der Haut (Epithelisierung mit Keratinozyten) mit Compound 21. Kontrolle (A, D und G), mit C21-Konzentration von 1×10^{-7} M (B, E und H) und mit C21-Konzentration von 1×10^{-6} M (C, F und I). Hämatoxylin-Färbung (A–I, lila) sowie immunhistologische Färbung (ACE, rot) mit Antikörpern gegen CK10 (D–F) bzw. Transglutaminase (F–I). Maßstab: 100 μ m.

Zur Evaluation einer Apoptose wurde eine TUNEL-Untersuchung durchgeführt. Während sich in der organotypischen Kultur mit der C21-Konzentration von 1×10^{-6} M einige TUNEL-positive Keratinozyten zeigten, waren in der Kultur mit der C21-Konzentration von 1×10^{-7} M sowie in der Kultur ohne C21 kaum positive Keratinozyten zu finden (Abbildung 36A–C).

Die Quantifizierung der Proliferation der Keratinozyten erfolgte mittels BrdU. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte bei beiden C21-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant geringere Anzahl BrdU-markierter Zellen (Abbildung 36D–F). Die Anzahl BrdU-positiver Zellen war um ca. 30 % (bei der C21-Konzentration von 1×10^{-7} M) bzw. um ca. 47 % (bei der C21-Konzentration von 1×10^{-6} M) reduziert (Abbildung 37).

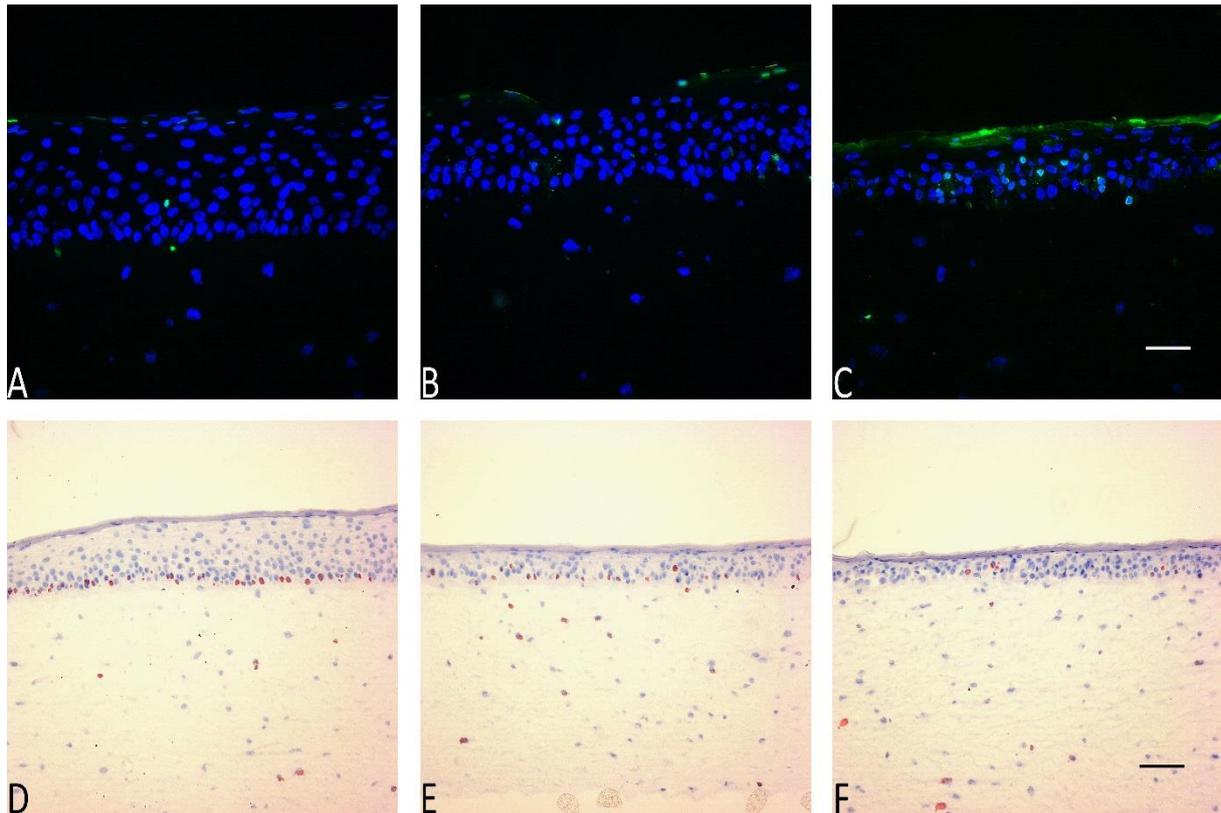


Abbildung 36: Organotypische Kultur der Haut (Epithelisierung mit Keratinozyten) mit Compound 21. Kontrolle (A und D), mit C21-Konzentration von 1×10^{-7} M (B und E) und mit C21-Konzentration von 1×10^{-6} M (C und F). TUNEL-Färbung (A–C) sowie immunhistologische Färbung (ACE, rot) mit Antikörpern gegen BrdU (D–F). Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin (lila). Maßstab: 50 μ m (A–C) bzw. 100 μ m (D–F).

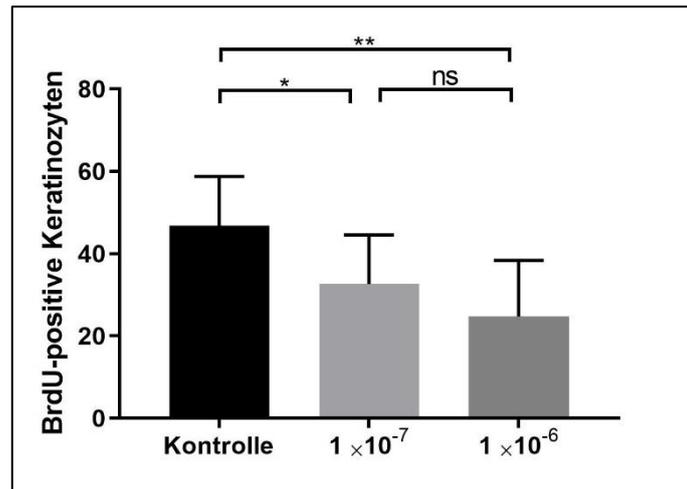


Abbildung 37: Anzahl der BrdU-positiven Keratinozyten in der organotypischen Kultur der Haut (Epithelisierung mit Keratinozyten) ohne bzw. mit C21 (1×10^{-7} M bzw. 1×10^{-6} M). Zufällig ausgewählte mikroskopisch aufgenommene Schnittbilder ($872 \times 691 \mu\text{m}$), Kontrolle, mit C21-Konzentration von 1×10^{-7} M und mit C21-Konzentration von 1×10^{-6} M; $n = 8$, $46,75 \pm 4,23$ vs. $32,63 \pm 4,21$ vs. $24,75 \pm 4,80$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns: nicht signifikant, $p > 0,05$.

5 Diskussion

5.1 Etablierung einer organotypischen Kultur des Plattenepithelkarzinoms mit Mastzellen

Bell und Kollegen etablierten 1981 die erste organotypische Kultur der Haut [7]. Seitdem wurde diese Form der Kultur ständig verbessert und für neue Fragestellungen genutzt (siehe Kapitel 1.1.1). Beispiele für den erweiterten Anwendungsbereich sind Analysen mit PEK-Zellen bzw. mit integrierten Mastzellen. Über organotypische Kulturen mit PEK-Zellen lässt sich das Verhalten der Tumorzellen im Epithelium analysieren [197]. Etablierte organotypische Kulturmodelle mit Mastzellen existieren bislang kaum. Die Arbeitsgruppe von Gailit berichtete 2001 zum ersten Mal über eine organotypische Kultur mit einer humanen Mastzelllinie (HMC-1) [202]. Ein Jahr später gelang es Artuc und Kollegen, primäre Mastzellen in die organotypische Kultur zu integrieren und eine Langzeitkultur anzulegen [195].

Die Schwierigkeit bei einer Co-Kultur mit verschiedenen Zelltypen liegt darin, dass sich Zellen, die unterschiedliche Medienzusammensetzungen sowie Kulturbedingungen benötigen, unter denselben Bedingungen entwickeln müssen, und das möglichst ohne Verlust ihrer natürlichen Eigenschaften. Dabei stellen Mastzellen aufgrund ihres relativ empfindlichen Verhaltens bereits in der Monokultur für viele Forscher eine Herausforderung dar [203,204].

Trotz der starken Vereinfachungen bezüglich des Aufbaus bzw. der zellulären Bestandteile im Vergleich zur echten Haut zeigten Keratinozyten in der organotypischen Kultur in Anwesenheit von Fibroblasten typische in-vivo-ähnliche Merkmale [205]. Dazu zählte eine schichtspezifische Differenzierung von proliferationsaktiven Basalzellen (Abbildung 5A) bis zu einer vollständigen kernlosen Verhornung mit typischen Differenzierungsmarkern [198,206–209] (Abbildung 5C und D). Zudem synthetisierten die Keratinozyten auch Proteinbestandteile der Basalmembran, wie Integrin $\beta 4$ (Abbildung 5B). Die Basalmembran fungiert nicht nur als Barriere, sondern auch als Reservoir für verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren [17]. Für die physiologische Gestaltung der epidermalen Struktur sowie der Basalmembran spielt eine Interaktion zwischen den Fibroblasten und Keratinozyten eine essenzielle Rolle [210,211]. Das von den Keratinozyten produzierte IL-1 α und IL-1 β induziert in Co-Kulturen in Fibroblasten die Expression von Keratinozyten-Wachstumsfaktoren, welche wiederum die Entwicklung

der Epidermis positiv beeinflussen [205].

Die beiden aus dem Gesichtsbereich isolierten Zelllinien SCC12 und SCC13 gelten als gut differenzierte PEK [212]. Auch in der organotypischen Kultur exprimierten sie mit CK17 einen PEK-typischen Marker (Abbildung 7C und D). Da sich PEK-Zellen durch Oberflächenmarker nicht sicher von Keratinozyten unterscheiden lassen, wurden in der vorliegenden Arbeit GFP-produzierende Tumorzellen genutzt. Dennoch war eine Detektion der Tumorzellen aufgrund der schlechten Differenzierung und erhöhten Proliferationstendenz auch ohne GFP in Ansätzen möglich (Abbildung 11).

Die in die organotypische Kultur aufgenommenen Mastzellen exprimierten auch in Langzeitkultur Mastzell-typische Mediatoren, wie Chymase und Tryptase (Abbildung 10 und Abbildung 11).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine organotypische Kultur mit vier Zelltypen – Keratinozyten, PEK-Zellen, Fibroblasten und Mastzellen – etabliert und für Untersuchungen zum Einfluss von Mastzellen sowie deren Mediatoren auf das PEK, unter in-vivo-ähnlichen Bedingungen genutzt.

5.2 Effekte von Histamin auf PEK-Zellen in der organotypischen Kultur – anti-proliferative Wirkung und Expressionsinhibition von VEGFR2

In Bezug auf die Morphologie sowie Proliferation führte eine Anwesenheit der Mastzellen in der organotypischen Kulturen zu keinen erkennbaren Unterschieden in den SCC12- sowie SCC13-Zellen (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.2). Eine Aktivierung der Mastzellen mit einem Antikörper gegen FcεRIα (29C6) hatte ebenfalls keinen sichtbaren Effekt (siehe Kapitel 4.3). Bei der Interpretation der Daten sollte berücksichtigt werden, dass die Antikörper möglicherweise aufgrund ihres hohen Molekulargewichts nicht in ausreichendem Maße ins Dermisäquivalent eindiffundieren konnten.

Um den Einfluss der Mastzellen auf das PEK detaillierter zu untersuchen, wurden die organotypischen Kulturen mit Histamin, einem Hauptmediator der Mastzellen, inkubiert. Bisherige Untersuchungen zum Effekt von Histamin auf das PEK der Haut wurden in Monokulturen durchgeführt und lieferten uneinheitliche Ergebnisse. Beispielsweise zeigten Tilly und Kollegen in einer kutanen PEK-Zelllinie (PEK A431) eine Zunahme der Zellzahl und DNA-Menge bei einer Inkubation mit Histamin [140]. Diese proliferative Wirkung verringerte sich bei Gabe eines H1-Rezeptor-Antagonisten [140]. Dagegen

fanden Liu und Kollegen bei derselben Zelllinie mittels WST-8-Messung (engl. water-soluble tetrazolium-8) eine anti-proliferative Wirkung von Histamin [141]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich dieses Ergebnis von Liu und Kollegen in der etablierten organotypischen Kultur bestätigen (siehe Kapitel 4.4). Sogar mit einer geringeren Konzentration von Histamin (10^{-5} M vs. 10^{-4} M in den o.g. Studien) konnte eine Reduktion des BrdU-Einbaus (Abbildung 17 und Abbildung 20) sowie der Ki-67-Expression (Abbildung 18 und Abbildung 21) in SCC12- und SCC13-Zellen nachgewiesen werden. Dahingegen zeigten diese Zelllinien in der Monokultur mit und ohne Histamin keine signifikanten Unterschiede (siehe Kapitel 4.5.4).

Eine Arbeitsgruppe fand in einer Organkultur der Haut einen gegenteiligen, das heißt proliferativen Effekt von Histamin auf gesunde Keratinozyten [213]. Dieser bemerkenswerte Unterschied bei der Reaktion von gesunden Keratinozyten und PEK-Zellen auf Histamin könnte in Zukunft möglicherweise therapeutisch genutzt werden.

Der Befund der vorliegenden Arbeit, dass die Expression von VEGFR2 in den beiden Tumorzelllinien nach Histamin-Gabe deutlich reduziert wurde (Abbildung 19 und Abbildung 22), verdeutlicht die potenzielle Beteiligung des VEGFR2-Signalwegs an der Proliferation der PEK-Zellen. Im Rahmen von Tumorerkrankungen ist VEGF ein wichtiger Stimulationsfaktor der Angiogenese, der für das Wachstum sowie die Metastasierung der Tumoren eine kritische Rolle spielt [214–216]. Besonders bei der Angiogenese im Rahmen neoplastischer Prozesse spielen VEGF-A sowie seine Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 eine zentrale Rolle [57]. Aufgrund der Bedeutung von VEGF für die Angiogenese kommen bei einigen Tumorerkrankungen bereits Medikamente zur Anwendung, die das VEGF-VEGFR-System blockieren. Zugelassen sind beispielsweise Bevacizumab (monoklonaler IgG1-Antikörper gegen VEGF-A) für das Kolonkarzinom, das metastasierte Mammakarzinom und das fortgeschrittene Lungenkarzinom sowie Ramucirumab (monoklonaler IgG1-Antikörper gegen VEGFR2) für das fortgeschrittene Magenkarzinom, das metastasierte kolorektale Karzinom und das kleinzellige Lungenkarzinom [217,218].

PEK-Zellen produzieren selber VEGF und fördern ihr eigenes Wachstum über einen autokrinen Signalweg [60,61], an dem VEGF-A, VEGFR2, Neuropilin-1 (Co-Rezeptor für VEGF) und Semaphorin beteiligt sind [61]. Der Befund der vorliegenden Arbeit ist ein Hinweis darauf, dass Histamin bei der VEGF/VEGFR2-vermittelten Proliferation der Tumorzellen eine Rolle spielt. Weitere Untersuchungen zur genauen Aufklärung des Pathomechanismus sowie klinische Studien mit bereits für andere Erkrankungen

zugelassenen Arzneimitteln wären äußerst sinnvoll, um gegebenenfalls eine Therapie für ein inoperables PEK zu entwickeln.

5.3 Antiproliferative und apoptotische Wirkung von Compound 21 auf das Plattenepithelkarzinom

PEK-Zellen exprimieren AT1R [219] sowie AT2R (siehe Kapitel 4.5.1). Die Wirkungen von Ang II auf das PEK wurden bislang kaum untersucht. Die bisherigen Untersuchungen mit Fokus auf dem Effekt einer Einnahme von AT1R-Antagonisten auf die Manifestation des PEK, ergaben widersprüchliche Ergebnisse [220,221]. Eine eindeutige Aussage, ob der wahrgenommene Effekt auf der Antagonisierung des Ang II Signals beruhte oder eher mit Komorbiditäten zusammenhing, war nicht möglich. Untersuchung zum AT2R-Effekt auf das PEK der Haut fehlen bislang. In anderen Tumoren, wie dem Prostatakarzinom [222], dem Blasenkarzinom [223] und dem Kolonkarzinom [224], soll eine Aktivierung von AT2R eine Apoptose bzw. eine Wachstumshemmung hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit konnte über den reduzierten BrdU-Einbau ebenfalls eine deutliche anti-proliferative Wirkung des AT2R-Antagonisten C21 auf SCC12- sowie SCC13-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 28 und Abbildung 30). Die positiven TUNEL-Signale nach einer Gabe von C21 deuten auf einen pro-apoptotischen Effekt hin.

Die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung von C21 auf das PEK eröffnet eine neue Tumortheraieoption, besonders bei inoperablen Tumoren oder dem Vorliegen von Fernmetastasen. Klinische Studien mit lokaler sowie systemischer Applikation von C21 auch als Kombinationstherapie mit der bis dato etablierten Chemotherapie wären sinnvoll.

5.4 Antiproliferative und apoptotische Wirkung von Compound 21 auf Keratinozyten in der organotypischen Kultur

Bisherige Untersuchungen lieferten Hinweise auf eine kritische Rolle von Ang II für die Homöostase der Haut. Die Haut verfügt über ein eigenes Renin-Angiotensin-System mit Angiotensin-Produktion und Expression von AT1R und AT2R [225]. Bei einer Verletzung kommt es zu einer gesteigerten Expression der beiden Rezeptoren [226]. Eine topische Anwendung von Ang II beschleunigt die Wundheilung [227]. Eine Antagonisierung des AT2R hemmt die Migration der Keratinozyten [228]. Der Mechanismus der

proliferationsfördernden Wirkung von Ang II ist bislang nicht verstanden [229].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von C21 auf Keratinozyten in der organotypischen Kultur untersucht. Der nachgewiesene anti-proliferative Effekt von C21 (Abbildung 37) war konzentrationsabhängig und betraf vor allem den basalen Bereich, wo auch in vivo die Proliferation stattfindet. Bei der höheren C21-Konzentration (1×10^{-6} M) wurde zudem eine Apoptose induziert (Abbildung 36). Des Weiteren führte eine C21-Gabe zur Differenzierung der Keratinozyten (Abbildung 35). In einer anderen Arbeit hemmte die C21-Gabe in einer Monokultur ebenfalls die Proliferation der Keratinozyten und förderte die Expression der Differenzierungsmarker Transglutaminase und Involucrin [230]. Psoriasis wird durch eine Hyperproliferation sowie eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten charakterisiert [231]. Eine klinische Analyse der lokalen Anwendung bei Psoriasis dürfte den Weg zu einer neuen symptomatischen Therapie der Erkrankung eröffnen.

5.5 Verhaltensunterschiede der Zellen in Abhängigkeit von der Kulturform

In der klassischen Monokultur verlieren die isolierten Zellen ihre spezifischen strukturell-morphologischen Eigenschaften, sodass Untersuchungen der Struktur sowie der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kommunikation keine validen, auf die in vivo Situation übertragbare Ergebnisse liefern [232]. Die unnatürlichen Untersuchungsbedingungen führen wahrscheinlich zu einer Veränderung des zellulären Verhaltens [233].

Zahlreiche Hinweise lassen vermuten, dass sich humane Zellen in einer organotypischen Kultur anders bzw. realitätsnäher verhalten als in einer Monokultur. Beispielsweise war eine Zelllinie des Kolonkarzinoms HCT-116 in einer organotypischen Kultur resistenter gegen einige Chemotherapeutika als in einer Monokultur [234]. Dieses Phänomen wurde auch beim Ovarialkarzinom beobachtet [235]. Auch Keratinozyten zeigten in einigen Studien ein unterschiedliches Verhalten in Abhängigkeit von der Kulturform. Eine Arbeitsgruppe stellte fest, dass Keratinozyten in einer organotypischen Kultur oxidativen Stress besser bewältigen [236]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Epimorphin in Keratinozyten je nach Kulturform die Aktivität des EGFR entweder verstärkt oder abschwächt [237]. In der vorliegenden Arbeit verhielten sich die PEK-Zelllinien SCC12 und SCC13 ebenfalls in Abhängigkeit von der Kulturform verschieden.

Die beiden Zelllinien gelten als gut differenzierte PEK. Sie stammen von Tumoren im

Gesichtsbereich [212]. Beide Zelllinien ließen sich in Monokultur mit vergleichbarer Proliferationsrate problemlos kultivieren (siehe Kapitel 4.1.3). Bemerkenswerterweise zeigten die beiden Zelllinien in der organotypischen Kultur aber deutliche Unterschiede. Besonders auffällig war das deutlich schwächer ausgeprägte Wachstum von SCC12- im Vergleich zu SCC13-Zellen (Abbildung 6 und Abbildung 7), während die jeweiligen Monokulturen keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten zeigten (siehe Kapitel 4.1.3). Bei der zusätzlichen Integration von Keratinozyten in die organotypische Kultur wurde dieses Phänomen noch deutlicher. Während SCC13-Zellen unter diesen Bedingungen Kolonien in der epidermalen Struktur bildeten (Abbildung 11), waren SCC12-Zellen kaum zu finden (Abbildung 10).

Verhaltensunterschiede in Abhängigkeit von der Kulturform ergaben sich auch in den Untersuchungen mit Histamin und C21. In der organotypischen Kultur führte die Histamin-Gabe zu einer signifikanten Reduktion Ki-67- und BrdU-positiver SCC12- und SCC13-Zellen (siehe Kapitel 4.4.1 und 4.4.2), wohingegen in den Monokulturen der beiden Zelllinien die Histamin-Gabe die Zellzahl nicht beeinflusste (siehe Kapitel 4.4.3). Auch C21 wirkte in der organotypischen Kultur proliferationshemmend auf SCC12- und SCC13-Zellen (siehe Kapitel 4.5.2 und 4.5.3) – ein Phänomen, das in der Monokultur nicht auftrat (siehe Kapitel 4.5.4).

Bisher konnte nicht geklärt werden, warum sich die Tumorzellen in den verschiedenen Kulturformen unterschiedlich verhalten. Drei mögliche Einflussfaktoren sollen im Folgenden diskutiert werden:

Erstens könnten die Fibroblasten in der Co-Kultur das Verhalten der Tumorzellen beeinflussen. Vorangegangene Untersuchungen deuten auf eine Interaktion zwischen Fibroblasten und dem PEK hin. Beispielsweise erkrankten Patienten mit Epidermolysis bullosa dystrophica, deren Fibroblasten das Wachstum von PEK-Zellen fördern, häufiger an diesem Tumor [41]. Umgekehrt rufen auch PEK-Zellen Veränderungen in den Fibroblasten hervor [238].

Zweitens könnte der Luftkontakt der Epithelzellschicht einen starken Reiz auf die dreidimensionalen Strukturbildung der Tumorzellen ausüben. PEK-Zellen sind grundsätzlich in der Lage, auch im Kulturmedium eine dreidimensionale Struktur zu bilden [239]. Jedoch kommt es zu einer Formation eines kleinen Zellaggregats [239], dessen Struktur von der soliden Struktur in der organotypischen Kultur der vorliegenden Arbeit deutlich abweicht. Laut einer weiteren Studie bilden Keratinozyten mit Luftkontakt deutlichere Schichten als im Medium [240]. Dieses Phänomen ist auch bei PEK-Zellen

denkbar und könnte somit das unterschiedliche Verhalten der Tumorzellen bedingen. Drittens ist auch ein potenzieller Einfluss der extrazellulären Materialien, wie Matrigel, zu diskutieren. Diesbezüglich gibt es bisher aber noch keine Untersuchungen.

5.6 Hochregulierung von β -Catenin in SCC13 und Wachstum des Plattenepithelkarzinoms in der organotypischen Kultur

Wie beschrieben, wuchsen SCC13-Zellen in der organotypischen Kultur deutlich schneller als SCC12-Zellen (siehe Kapitel 4.1.2), während die beiden Zelllinien in Monokultur mit ähnlichem Tempo proliferierten (siehe Kapitel 4.1.3). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob dieses Phänomen mit der Expression der Marker Integrin $\beta 4$ und β -Catenin korrelierte.

Integrin $\beta 4$ ist ein Bestandteil der Basalmembran in der physiologischen Haut. Im PEK ist die Integrin $\beta 4$ Expression oft deutlich erhöht, was mit einer erhöhten Invasion und Migration des Tumors einhergeht [69,70]. In der organotypischen Kultur zeigten beiden Zelllinien eine starke mehrschichtige Expression (Abbildung 7E und F). Integrin $\beta 4$ liegt an Integrin $\alpha 6$ gekoppelt (siehe auch Kapitel 1.3.5) und das freigesetzte Integrin $\alpha 6\beta 4$ im Tumor soll auf Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (z.B. EGFR, ErbB-2 und c-Met) sowie auf die Genexpression von z. B. Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt) und Mitogen-activated protein kinase (MAPK) wirken und die Tumorprogression befördern [68]. Die beiden Zelllinien SCC12 und SCC13 zeigten in der organotypischen Kultur keinen deutlichen Unterschied in der Integrin- $\beta 4$ -Expression.

β -Catenin ist ein Strukturprotein der Epithelzellen, welches durch eine Akkumulation über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg onkogen wirkt [63] (siehe auch Kapitel 1.3.4). In der vorliegenden Arbeit zeigten die beiden Zelllinien eine unterschiedliche Expression von β -Catenin in der organotypischen Kultur: Während SCC13-Zellen eine erhöhte β -Catenin-Expression aufwiesen, war das β -Catenin-Signal in SCC12-Zellen lediglich schwach (Abbildung 7C und D). Dieser Befund überrascht umso mehr, weil beide Zelllinien in der Monokultur eine vergleichbare β -Catenin-Expression zeigen [241,242]. Es wird angenommen, dass das β -Catenin-Signal die Proliferation [66] sowie die Invasion [67] des PEK verstärkt. Zudem können die Tumorzellen parakrin über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg ein abnormes Wachstum der benachbarten gesunden Keratinozyten induzieren [243]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass β -Catenin ein wichtiger Marker sein könnte, dessen Expression ein Überleben der Tumorzellen in einer physiologischen

Umwelt begünstigt.

Das Besondere der vorliegenden Untersuchung war, dass die Tumorzellen nicht in Monokultur, sondern in der organotypischen Kultur untersucht wurden. Bisherige Expressionsstudien (z. B. RBP-Jk [244], Bag-1 [245], TNFAIP3 [246] und p14ARF [247]) in SCC12- und SCC13-Zellen wurden in Monokulturen durchgeführt. Ob diese Befunde in der organotypischen Kultur reproduziert werden können, ist unklar (siehe Kapitel 5.5). Weitere Untersuchungen in der organotypischen Kultur wären somit sinnvoll.

5.7 Potenzial der organotypischen Kultur als Ersatz anderer Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde ein unterschiedliches Verhalten der SCC12- und SCC13-Zellen in Abhängigkeit von der Kulturform festgestellt. Daher stellt sich die Frage, welche Kulturform eher zu einem natürlichen Verhalten der Tumorzellen führt. Um diese Frage zu antworten, sollten die folgenden Befunde berücksichtigt werden.

Erstens wurde ein unterschiedliches Verhalten von SCC12- und SCC13- in der organotypischen Kultur und in der Monokultur festgestellt (siehe Kapitel 5.5).

Zweitens können in organotypischen Kulturen auch Effekte weiterer, benachbarter Zelltypen berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit trat in der organotypischen Kultur bei Anwesenheit von Keratinozyten eine reduzierte Tumorprogression auf, während die SCC12- und SCC13-Zellen ohne Keratinozyten ein mehrschichtiges Wachstum zeigten (siehe Kapitel 4.1.2). Zudem wurde unter dem Einfluss der Keratinozyten ein schlechtes Überleben von SCC12- (Abbildung 10) sowie eine Koloniebildung von SCC13-Zellen festgestellt (Abbildung 11). Ein Überleben der Tumorzellen sowie eine Tumorprogression in einer physiologischen Umwelt sind keine Selbstverständlichkeit. So zeigte eine Studie von Brown und Kollegen, dass die durch eine onkogene Mutation verursachte Veränderung im Haarfollikel von den gesunden Keratinozyten beseitigt wurde [248].

Drittens verhielten sich SCC12- und SCC13-Zellen in der organotypischen Kultur ähnlich wie in einem Tiermodell. Sauter und Kollegen untersuchten in Mäusen eine in-vivo-Tumorbildung nach einer subkutanen Injektion von SCC12- und SCC13-Zellen sowie von anderen Tumorzellen [249]. Während SCC13-Zellen deutliche Tumorherde bildeten, kam es auch bei der Injektion einer hohen Anzahl von SCC12-Zellen nur zu einem geringen subkutanen Tumorwachstum [249]. Dieses Ergebnis ist mit den Befunden der

organotypischen Kulturen, nicht aber der Monokulturen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Somit kann die klare Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich die SCC12- und SCC13-Zellen in der organotypischen Kultur deutlich in-vivo-ähnlicher verhalten als in einer Monokultur.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Überlegenheit der organotypischen Kultur gegenüber einer Monokultur. Bei den meisten Experimenten mit Monokulturen wurden grundsätzlich optimale Überlebensbedingungen für den jeweiligen Zelltyp gewählt, ohne die Interaktion mit der physiologischen Umgebung zu berücksichtigen. Die Befunde der vorliegenden Arbeit stellen die bisherigen auf Monokulturen basierenden Untersuchungsergebnisse zum Verhalten von PEK-Zellen infrage. Zugleich hat die organotypische Kultur sowohl aus ökonomischer als auch aus ethischer Sicht ein großes Potenzial als Ersatzinstrument für Tiermodell-basierte Analysen. Daher wäre es wünschenswert und sinnvoll, wenn sich das Verfahren als Alternative zu herkömmlichen Instrumenten in der Tumorforschungen etablieren könnte.

Literaturverzeichnis

1. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 9. Januar 2014.
2. Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol.* April 2011;8(4):189.
3. Reinbold R. Organotypic differentiation of the eye of the chick embryo in vitro. *C R Seances Soc Biol Fil.* September 1954;148(15–18):1493–5.
4. Freshney RI, Freshney RI. Organotypic Culture. *Cult Anim Cells.* 2005.
5. Rheinwald J, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* November 1975;6(3):331–43.
6. Freeman AE, Igel HJ, Herrman BJ, Kleinfeld KL. Growth and characterization of human skin epithelial cell cultures. *In Vitro.* 1. Mai 1976;12(5):352–62.
7. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 6. März 1981;211(4486):1052–4.
8. Asselineau D, Prunieras M. Reconstruction of ‘simplified’ skin: control of fabrication. *Br J Dermatol.* 1. Juli 1984;111:219–22.
9. Fusenig NE. Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro. In: *The Keratinocytes Handbook.* Cambridge: Cambridge University Press; 1994. S. 71–94.
10. Stark H-J, Boehnke K, Mirancea N, Willhauck MJ, Pavesio A, Fusenig NE, Boukamp P. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *J Investig Dermatol Symp Proc.* September 2006;11(1):93–105.
11. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore).* 1. Juni 2013;41(6):317–20.
12. Tay SS, Roediger B, Tong PL, Tikoo S, Weninger W. The Skin-Resident Immune Network. *Curr Dermatol Rep.* 2014;3:13–22.
13. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control.* 1. Dezember 2006;34(10, Supplement):S98–110.
14. Has C, Nyström A. Epidermal Basement Membrane in Health and Disease. *Curr Top Membr.* 2015;76:117–70.
15. Rippa AL, Vorotelyak EA, Vasiliev AV, Terskikh VV. The role of integrins in the development and homeostasis of the epidermis and skin appendages. *Acta Naturae.* Oktober 2013;5(4):22–33.

16. Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, Champlaud MF, Rest M, Burgeson RE. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol.* 11. August 1997;138(3):719–28.
17. Breitkreutz D, Koxholt I, Thiemann K, Nischt R. Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *BioMed Res Int [Internet].* 2013; Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3618921/> (abgerufen am: 15.06.2020).
18. Halprin KM. Epidermal „turnover time“—a re-examination. *Br J Dermatol.* Januar 1972;86(1):14–9.
19. Leinonen PT, Hägg PM, Peltonen S, Jouhilahti E-M, Melkko J, Korkiamäki T, Oikarinen A, Peltonen J. Reevaluation of the normal epidermal calcium gradient, and analysis of calcium levels and ATP receptors in Hailey-Hailey and Darier epidermis. *J Invest Dermatol.* Juni 2009;129(6):1379–87.
20. Eckert RL, Sturniolo MT, Broome A-M, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol.* März 2005;124(3):481–92.
21. Urmacher C. Histology of normal skin. *Am J Surg Pathol.* Juli 1990;14(7):671–86.
22. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):S3 Leitlinie Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut, Langversion 0.1(Konsultationsfassung), 2018AWMF Registernummer: 032/022OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/aktinische-keratosen-und-plattenepithelkarzinom-der-haut/> (abgerufen am: 15.06.2020).
23. Tellechea O, P Reis J, Domingues J, Poiaras Baptista A. Monoclonal Antibody Ber EP4 Distinguishes Basal-Cell Carcinoma from Squamous-Cell Carcinoma of the Skin. *Am J Dermatopathol.* 1. November 1993;15:452–5.
24. Yanofsky VR, Mercer SE, Phelps RG. Histopathological variants of cutaneous squamous cell carcinoma: a review. *J Skin Cancer.* 2011;2011:210813.
25. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017.
26. Schäfer I, Reusch M, Siebert J, Spehr C, Augustin M. Health care characteristics of basal cell carcinoma in Germany: the role of insurance status and socio-demographic factors. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG.* September 2014;12(9):803–11.
27. Thompson AK, Kelley BF, Prokop LJ, Murad MH, Baum CL. Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 1. April 2016;152(4):419–28.
28. Muzic JG, Schmitt AR, Wright AC, Alniemi DT, Zubair AS, Lourido JMO, Seda IMS, Weaver AL, Baum CL. Incidence and Trends of Basal Cell Carcinoma and

- Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *Mayo Clin Proc.* 1. Juni 2017;92(6):890–8.
29. Arndt KA, Travers RL. Editors' Note. *Arch Dermatol.* 1. November 2002;138(11):1427–1427.
 30. Australian Institute of Health and Welfare 2016. Skin cancer in Australia. Cat. no. CAN 96. Canberra: AIHW.
 31. Czarnecki D. Non-melanoma skin cancer mortality rising in susceptible Australians. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1. Juni 2017;31(6):e286–7.
 32. Hannuksela-Svahn A, Pukkala E, Karvonen J. Basal Cell Skin Carcinoma and Other Nonmelanoma Skin Cancers in Finland From 1956 Through 1995. *Arch Dermatol.* 1. Juli 1999;135(7):781–6.
 33. Preston DS, Stern RS. Nonmelanoma Cancers of the Skin. *N Engl J Med.* 3. Dezember 1992;327(23):1649–62.
 34. Thomas RF, Scotto J. Estimating Increases in Skin Cancer Morbidity Due to Increases in Ultraviolet Radiation Exposure. *Cancer Invest.* 1. Januar 1983;1(2):119–26.
 35. Iannacone MR, Wang W, Stockwell HG, O'Rourke K, Giuliano AR, Sondak VK, Messina JL, Roetzheim RG, Cherpelis BS, Fenske NA, Rollison DE. Patterns and timing of sunlight exposure and risk of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin – a case–control study. *BMC Cancer.* 20. September 2012;12:417.
 36. Green A, Battistutta D. Incidence and determinants of skin cancer in a high-risk Australian population. *Int J Cancer.* 15. September 1990;46(3):356–61.
 37. Gray DT, Suman VJ, Su WPD, Clay RP, Harmsen WS, Roenigk RK. Trends in the Population-Based Incidence of Squamous Cell Carcinoma of the Skin First Diagnosed Between 1984 and 1992. *Arch Dermatol.* 1. Juni 1997;133(6):735–40.
 38. Karagas MR, Greenberg ER, Spencer SK, Stukel TA, Mott LA. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. *Int J Cancer.* 17. Mai 1999;81(4):555–9.
 39. Glover MT, Niranjana N, Kwan JTC, Leigh IM. Non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients: the extent of the problem and a strategy for management. *Br J Plast Surg.* 1. Januar 1994;47(2):86–9.
 40. Liddington M, Richardson AJ, Higgins RM, Endre ZH, Venning VA, Murie JA, Morris PJ. Skin cancer in renal transplant recipients. *Br J Surg.* 1. Oktober 1989;76(10):1002–5.
 41. Ng Y-Z, Pourreyron C, Salas-Alanis JC, Dayal JHS, Cepeda-Valdes R, Yan W, Wright S, Chen M, Fine J-D, Hogg FJ, McGrath JA, Murrell DF, Leigh IM, Lane EB, South AP. Fibroblast-derived dermal matrix drives development of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cancer Res.* 15. Juli 2012;72(14):3522–34.

42. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. John Wiley & Sons; 2011. 209 S.
43. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 1. Juni 2010;17(6):1471–4.
44. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Röcken M, Breuninger H. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*. 1. August 2008;9(8):713–20.
45. Kwa RE, Campana K, Moy RL. Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. Januar 1992;26(1):1–26.
46. Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, Swanson NA. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J Am Acad Dermatol*. März 1992;26(3 Pt 2):467–84.
47. Dinehart SM, Nelson-Adesokan P, Cockerell C, Russell S, Brown R. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma derived from actinic keratosis. *Cancer*. 1. März 1997;79(5):920–3.
48. Dinehart SM, Pollack SV. Metastases from squamous cell carcinoma of the skin and lip. An analysis of twenty-seven cases. *J Am Acad Dermatol*. August 1989;21(2 Pt 1):241–8.
49. Al-Rohil RN, Tarasen AJ, Carlson JA, Wang K, Johnson A, Yelensky R, Lipson D, Elvin JA, Vergilio J-A, Ali SM, Suh J, Miller VA, Stephens PJ, Ganesan P, Janku F, Karp DD, Subbiah V, Mihm MC, Ross JS. Evaluation of 122 advanced-stage cutaneous squamous cell carcinomas by comprehensive genomic profiling opens the door for new routes to targeted therapies. *Cancer*. 15. Januar 2016;122(2):249–57.
50. DeConti RC. Chemotherapy of Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Semin Oncol*. 1. April 2012;39(2):145–9.
51. Lewis CM, Glisson BS, Feng L, Wan F, Tang X, Wistuba II, El-Naggar AK, Rosenthal DI, Chambers MS, Lustig RA, Weber RS. A Phase II Study of Gefitinib for Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res*. 1. März 2012;18(5):1435–46.
52. Wollina U. Cetuximab in non-melanoma skin cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 1. Juli 2012;12(7):949–56.
53. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A, Lewis KD, Chung CH, Hernandez-Aya L, Lim AM, Chang ALS, Rabinowits G, Thai AA, Dunn LA, Hughes BGM, Khushalani NI, Modi B, Schadendorf D, Gao B, Seebach F, Li S, Li J, Mathias M, Booth J, Mohan K, Stankevich E, Babiker HM, Brana I, Gil-Martin M, Homsí J, Johnson ML, Moreno V, Niu J, Owonikoko TK, Papadopoulos KP, Yancopoulos GD, Lowy I, Fury MG. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 26 2018;379(4):341–51.

54. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, Heath K, McClanahan T, Lunceford J, Gause C, Cheng JD, Chow LQ. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* Juli 2016;17(7):956–65.
55. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(10):611–25.
56. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life.* September 2009;61(9):915–22.
57. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 10. März 2006;312(5):549–60.
58. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* September 2005;13(3):205–20.
59. Elsner M. New role for VEGF. *Nat Biotechnol.* Dezember 2011;29(12):1101–1101.
60. Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, Conti CJ, Jorcano JL. Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor in Mouse Skin Carcinogenesis Correlates with Malignant Progression State and Activated H-ras Expression Levels. *Cancer Res.* 1. Dezember 1996;56(23):5391–6.
61. Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, Sotiropoulou PA, Loges S, Lapouge G, Candi A, Mascre G, Drogat B, Dekoninck S, Haigh JJ, Carmeliet P, Blanpain C. A vascular niche and a VEGF–Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature.* Oktober 2011;478(7369):399–403.
62. Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev.* Februar 2006;16(1):51–9.
63. Sherwood V, Leigh IM. WNT Signaling in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Future Treatment Strategy? *J Invest Dermatol.* 2016;136(9):1760–7.
64. Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1. Januar 2013;5(1):a007898.
65. Haider AS, Peters SB, Kaporis H, Cardinale I, Fei J, Ott J, Blumenberg M, Bowcock AM, Krueger JG, Carucci JA. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol.* April 2006;126(4):869–81.

66. Beronja S, Janki P, Heller E, Lien W-H, Keyes BE, Oshimori N, Fuchs E. RNAi screens in mice identify physiological regulators of oncogenic growth. *Nature*. 12. September 2013;501(7466):185–90.
67. Ibbetson SJ, Pyne NT, Pollard AN, Olson MF, Samuel MS. Mechanotransduction pathways promoting tumor progression are activated in invasive human squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. September 2013;183(3):930–7.
68. Stewart RL, O'Connor KL. Clinical significance of the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in human malignancies. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. September 2015;95(9):976–86.
69. Kashyap T, Germain E, Roche M, Lyle S, Rabinovitz I. Role of $\beta 4$ integrin phosphorylation in human invasive squamous cell carcinoma: regulation of hemidesmosome stability modulates cell migration. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. Oktober 2011;91(10):1414–26.
70. Moilanen JM, Löffek S, Kokkonen N, Salo S, Väyrynen JP, Hurskainen T, Manninen A, Riihilä P, Heljasvaara R, Franzke C-W, Kähäri V-M, Salo T, Mäkinen MJ, Tasanen K. Significant Role of Collagen XVII And Integrin $\beta 4$ in Migration and Invasion of The Less Aggressive Squamous Cell Carcinoma Cells. *Sci Rep*. 22 2017;7:45057.
71. Recklinghausen F v. Über Eiter- und Bindegewebkörperchen. *Virchows Arch Path Anat*. 1863;28:157–97.
72. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch mikr Anat*. 1877;13:263–78.
73. Beaven MA. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol*. Januar 2009;39(1):11–25.
74. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der granulirten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. *Arch Anat Physiol*. 1879;3:166–9.
75. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast Cell Function. *J Histochem Cytochem*. Oktober 2014;62(10):698–738.
76. Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol*. 1. Oktober 2011;32(10):478–85.
77. Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration That Human Mast Cells Arise From a Progenitor Cell Population That Is CD34+, c-kit +, and Expresses Aminopeptidase N (CD13). *Blood*. 1. Oktober 1999;94(7):2333–42.
78. Costa JJ, Demetri GD, Harrist TJ, Dvorak AM, Hayes DF, Merica EA, Menchaca DM, Gringeri AJ, Schwartz LB, Galli SJ. Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J Exp Med*. 1. Juni 1996;183(6):2681–6.
79. Valent P, Spanblöchl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, Strobl H, Geissler K, Bettelheim P, Lechner K. Induction of differentiation of human mast

- cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood*. 1. November 1992;80(9):2237–45.
80. Ihle JN, Keller J, Oroszlan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch F, Prystowsky MB, Goldwasser E, Schrader JW, Palaszynski E, Dy M, Lebel B. Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol*. 1. Juli 1983;131(1):282–7.
 81. Nakano T, Sonoda T, Hayashi C, Yamatodani A, Kanayama Y, Yamamura T, Asai H, Yonezawa T, Kitamura Y, Galli SJ. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med*. 1. September 1985;162(3):1025–43.
 82. Tertian G, Yung YP, Guy-Grand D, Moore MA. Long-term in vitro culture of murine mast cells. I. Description of a growth factor-dependent culture technique. *J Immunol*. 1. August 1981;127(2):788–94.
 83. Lambracht-Hall M, Dimitriadou V, Theoharides TC. Migration of mast cells in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1. November 1990;56(2):151–9.
 84. Theoharides TC. Mast cells: the immune gate to the brain. *Life Sci*. 1990;46(9):607–17.
 85. Jamur MC, Oliver C. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front Biosci Sch Ed*. 1. Juni 2011;3:1390–406.
 86. Weller CL, Collington SJ, Williams T, Lamb JR. Mast cells in health and disease. *Clin Sci*. 1. Juni 2011;120(11):473–84.
 87. Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. Oktober 1989;37(10):1509–15.
 88. Rao KN, Brown MA. Mast Cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1. November 2008;1143(1):83–104.
 89. Maurer M, Paus R, Czarnetzki BM. Mast cells as modulators of hair follicle cycling. *Exp Dermatol*. August 1995;4(4 Pt 2):266–71.
 90. Silberstein R, Melnick M, Greenberg G, Minkin C. Bone remodeling in W/W^v mast cell deficient mice. *Bone*. 1991;12(4):227–36.
 91. Caslin HL, Kiwanuka KN, Haque TT, Taruselli MT, MacKnight HP, Paranjape A, Ryan JJ. Controlling Mast Cell Activation and Homeostasis: Work Influenced by Bill Paul That Continues Today. *Front Immunol*. 2018;9:868.

92. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. November 2006;20(13):2366–8.
93. Younan GJ, Heit YI, Dastouri P, Kekhia H, Xing W, Gurish MF, Orgill DP. Mast cells are required in the proliferation and remodeling phases of microdeformational wound therapy. *Plast Reconstr Surg*. Dezember 2011;128(6):649e–58e.
94. Theoharides TC, Alysandratos K-D, Angelidou A, Delivanis D-A, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. Januar 2012;1822(1):21–33.
95. Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamelli RL, DiPietro LA. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. Februar 2003;11(1):46–54.
96. Lin L, Bankaitis E, Heimbach L, Li N, Abrink M, Pejler G, An L, Diaz LA, Werb Z, Liu Z. Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. *J Biol Chem*. 28. Oktober 2011;286(43):37358–67.
97. Takato H, Yasui M, Ichikawa Y, Waseda Y, Inuzuka K, Nishizawa Y, Tagami A, Fujimura M, Nakao S. The specific chymase inhibitor TY-51469 suppresses the accumulation of neutrophils in the lung and reduces silica-induced pulmonary fibrosis in mice. *Exp Lung Res*. März 2011;37(2):101–8.
98. Dvorak AM. Mast Cell-Derived Mediators of Enhanced Microvascular Permeability, Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor, Histamine, and Serotonin, Cause Leakage of Macromolecules through a New Endothelial Cell Permeability Organelle, the Vesiculo-Vacuolar Organelle. *Ultrastruct Mast Cells Basophils*. 2005;85:185–204.
99. Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: More than meets the eye? *Exp Dermatol*. August 2013;22(8):507–10.
100. Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol*. Mai 1990;94(5):624–9.
101. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, Hashimoto K. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci*. 1. Juni 2005;118(Pt 11):2363–70.
102. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12. Mai 1998;95(10):5672–7.
103. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. Dezember 1999;79(12):1479–87.

104. Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. August 1992;89(15):6896–900.
105. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 4. November 1994;266(5186):819–22.
106. Li AK, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA, Young M. Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juli 1980;77(7):4379–81.
107. Yaar M, Grossman K, Eller M, Gilchrest BA. Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J Cell Biol*. November 1991;115(3):821–8.
108. Knight PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med*. 18. Dezember 2000;192(12):1849–56.
109. Maurer M, Kostka SL, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von Stebut E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J*. 1. Dezember 2006;20(14):2460–7.
110. Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*. Juli 2010;40(7):1843–51.
111. Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N, Nakanishi K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J Exp Med*. 5. September 2005;202(5):607–16.
112. Piliponsky AM, Chen C-C, Grimbaldston MA, Burns-Guydish SM, Hardy J, Kalesnikoff J, Contag CH, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-derived TNF can exacerbate mortality during severe bacterial infections in C57BL/6-Kit^{W-sh/W-sh} mice. *Am J Pathol*. Februar 2010;176(2):926–38.
113. Köckritz-Blickwede M von, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 15. März 2008;111(6):3070–80.
114. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature*. 25. November 2004;432(7016):512–6.
115. Orinska Z, Bulanova E, Budagian V, Metz M, Maurer M, Bulfone-Paus S. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8⁺ T-cell recruitment. *Blood*. 1. August 2005;106(3):978–87.

116. Castleman WL, Sorkness RL, Lemanske RF, McAllister PK. Viral bronchiolitis during early life induces increased numbers of bronchiolar mast cells and airway hyperresponsiveness. *Am J Pathol.* Oktober 1990;137(4):821–31.
117. Sundstrom JB, Ellis JE, Hair GA, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD, Yi H, Cardona AC, Lindsay MK, Ansari AA. Human tissue mast cells are an inducible reservoir of persistent HIV infection. *Blood.* 15. Juni 2007;109(12):5293–300.
118. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* Februar 2005;6(2):135–42.
119. Ra C, Jouvin MH, Blank U, Kinet JP. A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature.* 26. Oktober 1989;341(6244):752–4.
120. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol [Internet].* 6. Januar 2016;6. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4701915/> (abgerufen am: 15.06.2020).
121. Sibilano R, Frossi B, Pucillo CE. Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways. *Eur J Immunol.* September 2014;44(9):2558–66.
122. Hitomi T, Zhang J, Nicoletti LM, Grodzki ACG, Jamur MC, Oliver C, Siraganian RP. Phospholipase D1 regulates high-affinity IgE receptor-induced mast cell degranulation. *Blood.* 15. Dezember 2004;104(13):4122–8.
123. Barbu EA, Zhang J, Berenstein EH, Groves JR, Parks LM, Siraganian RP. The transcription factor Zeb2 regulates signaling in mast cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. Juni 2012;188(12):6278–86.
124. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* März 2006;6(3):218–30.
125. Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol.* März 1988;81(3):590–7.
126. Simons FER. Advances in H1-antihistamines. *N Engl J Med.* 18. November 2004;351(21):2203–17.
127. Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, Church MK, Saluja R. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 2018;9:1873.
128. Passani MB, Lin J-S, Hancock A, Crochet S, Blandina P. The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol Sci.* Dezember 2004;25(12):618–25.
129. Medhurst SJ, Collins SD, Billinton A, Bingham S, Dalziel RG, Brass A, Roberts JC, Medhurst AD, Chessell IP. Novel histamine H3 receptor antagonists

- GSK189254 and GSK334429 are efficacious in surgically-induced and virally-induced rat models of neuropathic pain. *Pain*. 15. August 2008;138(1):61–9.
130. Sadek B, Saad A, Sadeq A, Jalal F, Stark H. Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. *Behav Brain Res*. 01 2016;312:415–30.
131. Attoub S, Moizo L, Sobhani I, Laigneau JP, Lewin MJ, Bado A. The H3 receptor is involved in cholecystokinin inhibition of food intake in rats. *Life Sci*. 15. Juni 2001;69(4):469–78.
132. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung W-P. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*. Juni 2003;305(3):1212–21.
133. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, Fung-Leung W-P. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol*. Mai 2004;142(1):161–71.
134. Dunford PJ, O'Donnell N, Riley JP, Williams KN, Karlsson L, Thurmond RL. The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Juni 2006;176(11):7062–70.
135. Mikhail GR, Miller-Milinska A. Mast Cell Population in Human Skin**From the Department of Dermatology, Wayne State University College of Medicine and Detroit Receiving Hospital, Detroit, Michigan. *J Invest Dermatol*. 1. Oktober 1964;43(4):249–54.
136. Claudatus JC, d'Ovidio R, Lospalluti M, Meneghini CL. Skin tumors and reactive cellular infiltrate: further studies. *Acta Derm Venereol*. 1986;66(1):29–34.
137. Nakamura K, Tanaka T, Morita E, Kameyoshi Y, Yamamoto S. Enhancement of fibroblast-dependent mast cell growth in mice by a conditioned medium of keratinocyte-derived squamous cell carcinoma cells. *Arch Dermatol Res*. 1. Dezember 1994;287(1):91–6.
138. Kanda N, Watanabe S. Histamine Inhibits the Production of Interferon-induced Protein of 10 kDa in Human Squamous Cell Carcinoma and Melanoma. *J Invest Dermatol*. 1. Dezember 2002;119(6):1411–9.
139. Artuc M, Guhl S, Babina M, Unger T, Steckelings UM, Zuberbier T. Mast cell-derived TNF- α and histamine modify IL-6 and IL-8 expression and release from cutaneous tumor cells. *Exp Dermatol*. Dezember 2011;20(12):1020–2.
140. Tilly BC, Tertoolen LG, Remorie R, Ladoux A, Verlaan I, de Laat SW, Moolenaar WH. Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca²⁺-mobilizing H1 receptors. *J Cell Biol*. April 1990;110(4):1211–5.
141. Liu G-W, Cao Y-X, Wang J-L, Chen L. The influence of histamine on growth and migration of skin squamous cancer cells. *J Clin Dermatol*. 5. Mai 2014;43:275–8.

142. Steckelings UM, Unger T. The renin–angiotensin–aldosterone system. In: Manual of Hypertension of the European Society of Hypertension. 2. Aufl. London: Informa Healthcare: CRC Press; 2008. S. 141–8.
143. Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med*. 1. März 1956;103(3):295–9.
144. Braun-Menendez E, Page IH. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science*. 31. Januar 1958;127(3292):242.
145. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 30. August 1989;163(1):284–91.
146. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 30. November 1989;165(1):196–203.
147. Speth RC, Kim KH. Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine⁶ angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun*. 29. Juni 1990;169(3):997–1006.
148. Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Timmermans PB. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Mai 1991;17(5):720–1.
149. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. September 2000;52(3):415–72.
150. Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 15. Dezember 1993;197(2):393–9.
151. Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun*. 30. September 1994;203(3):1842–50.
152. Servant G, Dudley DT, Escher E, Guillemette G. The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation. *Mol Pharmacol*. Juni 1994;45(6):1112–8.
153. Hines J, Heerding JN, Fluharty SJ, Yee DK. Identification of Angiotensin II Type 2 (AT2) Receptor Domains Mediating High-Affinity CGP 42112A Binding and Receptor Activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1. August 2001;298(2):665–73.
154. Karnik SS, Unal H, Kemp JR, Tirupula KC, Eguchi S, Vanderheyden PML, Thomas WG. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacol Rev*. 1. Oktober 2015;67(4):754–819.

155. Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Schefe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T. Regulation of transport of the angiotensin AT₂ receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Januar 2005;25(1):57–64.
156. Nouet S, Amzallag N, Li J-M, Louis S, Seitz I, Cui T-X, Alleaume A-M, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud P-O, Nahmias C. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT₂ receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem.* 9. Juli 2004;279(28):28989–97.
157. Matsubara H, Shibasaki Y, Okigaki M, Mori Y, Masaki H, Kosaki A, Tsutsumi Y, Uchiyama Y, Fujiyama S, Nose A, Iba O, Tateishi E, Hasegawa T, Horiuchi M, Nahmias C, Iwasaka T. Effect of angiotensin II type 2 receptor on tyrosine kinase Pyk2 and c-Jun NH₂-terminal kinase via SHP-1 tyrosine phosphatase activity: evidence from vascular-targeted transgenic mice of AT₂ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 20. April 2001;282(5):1085–91.
158. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest.* August 2000;106(3):R25-29.
159. Steckelings UM, Widdop RE, Paulis L, Unger T. The angiotensin AT₂ receptor in left ventricular hypertrophy. *J Hypertens.* September 2010;28 Suppl 1:S50-55.
160. Jassal B, Jupe S, Caudy M, Birney E, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. The systematic annotation of the three main GPCR families in Reactome. *Database J Biol Databases Curation.* 29. Juli 2010;2010:baq018.
161. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, Johansson B, Holm M, Botoros M, Karlén A, Pettersson A, Nyberg F, Fändriks L, Gallo-Payet N, Hallberg A, Alterman M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the First Selective Nonpeptide AT₂ Receptor Agonist. *J Med Chem.* 1. November 2004;47(24):5995–6008.
162. Brechler V, Jones PW, Levens NR, de Gasparo M, Bottari SP. Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT₂ receptor in PC12W cells. *Regul Pept.* 19. März 1993;44(2):207–13.
163. Macari D, Whitebread S, Cumin F, De Gasparo M, Levens N. Renal actions of the angiotensin AT₂ receptor ligands CGP 42112 and PD 123319 after blockade of the renin-angiotensin system. *Eur J Pharmacol.* 23. Juni 1994;259(1):27–36.
164. Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, Inada M. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res.* September 1993;73(3):439–47.
165. Bastien NR, Ciuffo GM, Saavedra JM, Lambert C. Angiotensin II receptor expression in the conduction system and arterial duct of neonatal and adult rat hearts. *Regul Pept.* 7. Mai 1996;63(1):9–16.

166. Steckelings UM, Henz BM, Wiehstutz S, Unger T, Artuc M. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *Br J Dermatol*. November 2005;153(5):887–93.
167. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest*. Januar 1995;95(1):46–54.
168. Busche S, Gallinat S, Bohle RM, Reinecke A, Seebeck J, Franke F, Fink L, Zhu M, Sumners C, Unger T. Expression of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am J Pathol*. August 2000;157(2):605–11.
169. Li J, Culman J, Hörtnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. April 2005;19(6):617–9.
170. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, Justo P, Ortiz A, Egido J. Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl*. Oktober 2003;(86):S21-26.
171. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. November 1995;92(23):10663–7.
172. Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Illasaca MA, Libby P, Dzau VJ, Pratt RE. Angiotensin Type 2 Receptor Is Expressed in Murine Atherosclerotic Lesions and Modulates Lesion Evolution. *Circulation*. 22. November 2005;112(21):3328–36.
173. Johansson ME, Fagerberg B, Bergström G. Angiotensin type 2 receptor is expressed in human atherosclerotic lesions
Angiotensin type 2 receptor is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 1. März 2008;9(1):17–21.
174. Terenzi R, Manetti M, Rosa I, Romano E, Galluccio F, Guiducci S, Ibbamanneschi L, Matucci-Cerinic M. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) as a novel modulator of inflammation in rheumatoid arthritis synovium. *Sci Rep*. 16. Oktober 2017;7(1):13293.
175. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*. 26. Oktober 1995;377(6551):744–7.
176. Graham KA, Reaich D, Channon SM, Downie S, Goodship TH. Correction of acidosis in hemodialysis decreases whole-body protein degradation. *J Am Soc Nephrol JASN*. April 1997;8(4):632–7.
177. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis

- and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci.* 1998;63(19):PL289-295.
178. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 26. Oktober 1995;377(6551):748–50.
 179. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT₂ receptor causes attenuated response to AT₁ receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest.* 1. Februar 1998;101(3):527–35.
 180. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest.* Oktober 1999;104(7):925–35.
 181. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation.* 9. Dezember 2008;118(24):2523–32.
 182. Gao J, Zucker IH, Gao L. Activation of central angiotensin type 2 receptors by compound 21 improves arterial baroreflex sensitivity in rats with heart failure. *Am J Hypertens.* Oktober 2014;27(10):1248–56.
 183. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Dallas Tex 1979.* Februar 2012;59(2):291–9.
 184. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, Castiglioni L, Turolo L, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L. Stimulation of AT₂ receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J Hypertens.* Dezember 2009;27(12):2444–51.
 185. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin AT₂ receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertens Dallas Tex 1979.* Februar 2011;57(2):308–13.
 186. Min L-J, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Nakaoka H, Kan-No H, Wang X-L, Chisaka T, Bai H-Y, Iwanami J, Horiuchi M. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage. *Am J Hypertens.* August 2014;27(8):1036–44.
 187. McCarthy CA, Vinh A, Miller AA, Hallberg A, Alterman M, Callaway JK, Widdop RE. Direct angiotensin AT₂ receptor stimulation using a novel AT₂ receptor

- agonist, compound 21, evokes neuroprotection in conscious hypertensive rats. *PLoS One*. 2014;9(4):e95762.
188. Borowiec A-S, Delcourt P, Dewailly E, Bidaux G. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS One*. 2013;8(10):e77507.
 189. Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol*. Juli 1983;81(1 Suppl):33s–40s.
 190. Lawrence ID, Warner JA, Cohan VL, Hubbard WC, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Purification and characterization of human skin mast cells. Evidence for human mast cell heterogeneity. *J Immunol*. 1. November 1987;139(9):3062–9.
 191. Grützkau A, Henz BM, Kirchhof L, Luger T, Artuc M. α -Melanocyte Stimulating Hormone Acts as a Selective Inducer of Secretory Functions in Human Mast Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 11. November 2000;278(1):14–9.
 192. Guhl S, Artuc M, Neou A, Babina M, Zuberbier T. Long-Term Cultured Human Skin Mast Cells Are Suitable for Pharmacological Studies of Anti-Allergic Drugs Due to High Responsiveness to Fc ϵ RI Cross-Linking. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(2):382–4.
 193. Normand J, Karasek MA. 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*. 1995;31(6):447–55.
 194. Poumay Y, Pittelkow MR. Cell Density and Culture Factors Regulate Keratinocyte Commitment to Differentiation and Expression of Suprabasal K1/K10 Keratins. *J Invest Dermatol*. Februar 1995;104(2):271–6.
 195. Artuc M, Steckelings UM, Grützkau A, Smorodchenko A, Henz BM. A long-term coculture model for the study of mast cell-keratinocyte interactions. *J Invest Dermatol*. August 2002;119(2):411–5.
 196. Stark H-J, Willhauck MJ, Mirancea N, Boehnke K, Nord I, Breitzkreutz D, Pavesio A, Boukamp P, Fusenig NE. Authentic fibroblast matrix in dermal equivalents normalises epidermal histogenesis and dermoepidermal junction in organotypic co-culture. *Eur J Cell Biol*. Dezember 2004;83(11–12):631–45.
 197. Zhang W, Vaccariello MA, Wang Y, Alt-Holland A, Fusenig NE, Garlick JA. Escape from microenvironmental control and progression of intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 10. Oktober 2005;116(6):885–93.
 198. Tsunenaga M, Kohno Y, Horii I, Yasumoto S, Huh N, Tachikawa T, Yoshiki S, Kuroki T. Growth and Differentiation Properties of Normal and Transformed Human Keratinocytes in Organotypic Culture. *Jpn J Cancer Res*. März 1994;85(3):238–44.
 199. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-

- synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol.* Juni 1989;18(3):311–8.
200. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* März 2000;182(3):311–22.
201. Leblebici C, Pasaoglu E, Kelten C, Darakci S, Dursun N. Cytokeratin 17 and Ki-67: Immunohistochemical markers for the differential diagnosis of keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* April 2017;13(4):2539–48.
202. Gailit J, Marchese MJ, Kew RR, Gruber BL. The Differentiation and Function of Myofibroblasts is Regulated by Mast Cell Mediators. *J Invest Dermatol.* 1. November 2001;117(5):1113–9.
203. Howard Green. *Nat Rev Genet.* 29. Mai 2012;13:453.
204. Rådinger M, Jensen BM, Kuehn HS, Kirshenbaum A, Gilfillan AM. Generation, isolation, and maintenance of human mast cells and mast cell lines derived from peripheral blood or cord blood. *Curr Protoc Immunol.* August 2010;Chapter 7:Unit 7.37.
205. Maas-Szabowski N, Stark H-J, Fusenig NE. Keratinocyte Growth Regulation in Defined Organotypic Cultures Through IL-1-Induced Keratinocyte Growth Factor Expression in Resting Fibroblasts. *J Invest Dermatol.* Juni 2000;114(6):1075–84.
206. Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Darmon M. Retinoic acid improves epidermal morphogenesis. *Dev Biol.* 1. Juni 1989;133(2):322–35.
207. Lenoir MC, Bernard BA. Architecture of Reconstructed Epidermis on Collagen Lattices Varies according to the Method Used: A Comparative Study. *Skin Pharmacol Physiol.* 1990;3(2):97–106.
208. Parenteau NL, Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS, Rosenberg M. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology.* 1992;9(1–3):163–71.
209. Igarashi M, Irwin CR, Locke M, Mackenzie IC. Construction of large area organotypical cultures of oral mucosa and skin. *J Oral Pathol Med.* 1. August 2003;32(7):422–30.
210. Smola H, Stark H-J, Thiekötter G, Mirancea N, Krieg T, Fusenig NE. Dynamics of Basement Membrane Formation by Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Organotypic Skin Culture. *Exp Cell Res.* 15. März 1998;239(2):399–410.
211. Marionnet C, Pierrard C, Vioux-Chagnoleau C, Sok J, Asselineau D, Bernerd F. Interactions between Fibroblasts and Keratinocytes in Morphogenesis of Dermal Epidermal Junction in a Model of Reconstructed Skin. *J Invest Dermatol.* Mai 2006;126(5):971–9.
212. Rheinwald JG, Beckett MA. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* Mai 1981;41(5):1657–63.

213. Maurer M, Opitz M, Henz BM, Paus R. The mast cell products histamine and serotonin stimulate and TNF- α inhibits the proliferation of murine epidermal keratinocytes in situ. *J Dermatol Sci*. 1. November 1997;16(1):79–84.
214. Larcher F, Murillas R, Bolontrade M, Conti CJ, Jorcano JL. VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene*. 23. Juli 1998;17(3):303–11.
215. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*. 4. April 2005;201(7):1089–99.
216. Moussai D, Mitsui H, Pettersen JS, Pierson KC, Shah KR, Suárez-Fariñas M, Cardinale IR, Bluth MJ, Krueger JG, Carucci JA. The Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Microenvironment Is Characterized by Increased Lymphatic Density and Enhanced Expression of Macrophage-Derived VEGF-C. *J Invest Dermatol*. 1. Januar 2011;131(1):229–36.
217. Summary of the European public assessment report (EPAR) for Avastin. [Internet]. European Medicines Agency; 2017 Juni. Report No.: EMA/302947/2017. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000582/WC500029260.pdf (abgerufen am: 15.06.2020).
218. Summary of the European public assessment report (EPAR) for Cyramza. [Internet]. European Medicines Agency; 2016 Feb. Report No.: EMA/42349/2016. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/human/medicines/002829/human_med_001825.jsp (abgerufen am: 15.06.2020).
219. Takeda H, Kondo S. Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type-1 receptor expression. *Am J Pathol*. Mai 2001;158(5):1633–7.
220. Moscarelli L, Zanazzi M, Mancini G, Rossi E, Caroti L, Rosso G, Bertoni E, Salvadori M. Keratinocyte cancer prevention with ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers or their combination in renal transplant recipients. *Clin Nephrol*. Juni 2010;73(6):439–45.
221. Nardone B, Majewski S, Kim AS, Kiguradze T, Martinez-Escala EM, Friedland R, Amin A, Laumann AE, Edwards BJ, Rademaker AW, Martini MC, West DP. Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancer Associated with Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitors, Angiotensin-Receptor Blockers and Thiazides: A Matched Cohort Study. *Drug Saf*. 2017;40(3):249–55.
222. Li H, Qi Y, Li C, Braseth LN, Gao Y, Shabashvili AE, Katovich MJ, Sumners C. Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. Dezember 2009;8(12):3255–65.
223. Pei N, Mao Y, Wan P, Chen X, Li A, Chen H, Li J, Wan R, Zhang Y, Du H, Chen B, Jiang G, Xia M, Sumners C, Hu G, Gu D, Li H. Angiotensin II type 2 receptor

- promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 09 2017;36(1):77.
224. Ager EI, Chong WW, Wen S-W, Christophi C. Targeting the angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in colorectal liver metastases. *Cancer Cell Int*. 28. Juni 2010;10:19.
225. Steckelings UM, Wollschläger T, Peters J, Henz BM, Hermes B, Artuc M. Human skin: source of and target organ for angiotensin II. *Exp Dermatol*. März 2004;13(3):148–54.
226. Viswanathan M, Saavedra JM. Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides*. August 1992;13(4):783–6.
227. Rodgers K, Abiko M, Girgis W, St Amand K, Campeau J, diZerega G. Acceleration of dermal tissue repair by angiotensin II. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. Juni 1997;5(2):175–83.
228. Sakai H, Matsuura K, Tanaka Y, Honda T, Nishida T, Inui M. Signaling mechanism underlying the promotion of keratinocyte migration by angiotensin II. *Mol Pharmacol*. Februar 2015;87(2):277–85.
229. Steckelings UM, Artuc M, Paul M, Stoll M, Henz BM. Angiotensin II stimulates proliferation of primary human keratinocytes via a non-AT1, non-AT2 angiotensin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 4. Dezember 1996;229(1):329–33.
230. Sadegh Pour Saleh H. Effekt einer pharmakologischen Angiotensin AT2-Rezeptor-Stimulation auf Proliferation und Differenzierung humaner primärer Keratinozyten. [Diplomarbeit]. Technische Universität Berlin; 2010.
231. Ghoreschi K, Röcken M. [Immunopathogenesis of psoriasis]. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. Juli 2003;1(7):524–32.
232. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov Adv Life Sci R D*. 2017;22(5):456–72.
233. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*. 23. November 2001;294(5547):1708–12.
234. Karlsson H, Fryknäs M, Larsson R, Nygren P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp Cell Res*. 1. August 2012;318(13):1577–85.
235. Sodek KL, Ringuette MJ, Brown TJ. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *Int J Cancer*. 1. Mai 2009;124(9):2060–70.
236. Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol*. 10. April 2006;122(3):372–81.

237. Okugawa Y, Hirai Y. Extracellular epimorphin modulates epidermal differentiation signals mediated by epidermal growth factor receptor. *J Dermatol Sci.* 1. März 2013;69(3):236–42.
238. Toutfaire M, Dumortier E, Fattaccioli A, Van Steenbrugge M, Proby CM, Debacq-Chainiaux F. Unraveling the interplay between senescent dermal fibroblasts and cutaneous squamous cell carcinoma cell lines at different stages of tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;98:113–26.
239. Rossow L, Eke I, Dickreuter E, Cordes N. Targeting of the EGFR/ β 1 integrin connecting proteins PINCH1 and Nck2 radiosensitizes three-dimensional SCC cell cultures. *Oncol Rep.* Juli 2015;34(1):469–76.
240. Seo A, Kitagawa N, Matsuura T, Sato H, Inai T. Formation of keratinocyte multilayers on filters under airlifted or submerged culture conditions in medium containing calcium, ascorbic acid, and keratinocyte growth factor. *Histochem Cell Biol.* 1. November 2016;146(5):585–97.
241. Zhang Q-L, Lian D-D, Zhu MJ, Li XM, Lee JK, Yoon T-J, Lee J-H, Jiang R-H, Kim CD. Antitumor Effect of Albendazole on Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (SCC) Cells. *BioMed Res Int.* 2019;2019:3689517.
242. Li XM, Piao YJ, Sohn K-C, Ha J-M, Im M, Seo Y-J, Whang KU, Lee J-H, Lee Y, Kim CD. Sox9 is a β -catenin-regulated transcription factor that enhances the colony-forming activity of squamous cell carcinoma cells. *Mol Med Rep.* Juli 2016;14(1):337–42.
243. Deschene ER, Myung P, Rompolas P, Zito G, Sun TY, Taketo MM, Saotome I, Greco V. β -Catenin activation regulates tissue growth non-cell autonomously in the hair stem cell niche. *Science.* 21. März 2014;343(6177):1353–6.
244. Al Labban D, Jo S-H, Ostano P, Saglietti C, Bongiovanni M, Panizzon R, Dotto GP. Notch-effector CSL promotes squamous cell carcinoma by repressing histone demethylase KDM6B. *J Clin Invest.* 1. Juni 2018;128(6):2581–99.
245. Wood J, Pring M, Eveson JW, Price N, Proby CM, Hague A. Co-overexpression of Bag-1 and heat shock protein 70 in human epidermal squamous cell carcinoma: Bag-1-mediated resistance to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Br J Cancer.* 26. April 2011;104(9):1459–71.
246. Sohn K-C, Li ZJ, Choi D-K, Zhang T, Lim JW, Chang I-K, Hur GM, Im M, Lee Y, Seo Y-J, Lee J-H, Kim CD. Imiquimod induces apoptosis of squamous cell carcinoma (SCC) cells via regulation of A20. *PLoS One.* 2014;9(4):e95337.
247. Munro J, Stott FJ, Vousden KH, Peters G, Parkinson EK. Role of the alternative INK4A proteins in human keratinocyte senescence: evidence for the specific inactivation of p16INK4A upon immortalization. *Cancer Res.* 1. Juni 1999;59(11):2516–21.
248. Brown S, Pineda CM, Xin T, Boucher J, Suozzi KC, Park S, Matte-Martone C, Gonzalez DG, Rytlewski J, Beronja S, Greco V. Correction of aberrant growth preserves tissue homeostasis. *Nature.* August 2017;548(7667):334–7.

-
249. Sauter ER, Herlyn M, Liu SC, Litwin S, Ridge JA. Prolonged response to antisense cyclin D1 in a human squamous cancer xenograft model. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* Februar 2000;6(2):654–60.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Jonghui Kim, an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Potenzial der organotypischen Kultur der Haut sowie des Hauttumors als ein in vivo-ähnliches Untersuchungsinstrument“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/-innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Kapitel zur Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und den Ergebnissen (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/-in angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen dieser Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der „Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis“ verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jonghui Kim hatte Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: (Buchkapitel) **Kim, J.**, Guhl, S., Babina, M., Zuberbier, T., Artuc, M.; *Integration of the Human Dermal Mast Cell into the Organotypic Co-culture Skin Model*. Basophils and Mast Cells (Herausgeber: Gibbs, B. F., Falcone, F. H.), S. 69–85. Springer New York, 2014.

Beiträge im Einzelnen: Jonghui Kim war an der Studienplanung zusammen mit Prof. Zuberbier und Dr. Artuc maßgeblich mitbeteiligt. Herr Kim war für die Durchführung der gesamten experimentellen Arbeit zuständig. Außerdem erstellte Herr Kim das Manuskript und überarbeitete die Korrekturen der Co-Autoren.

Publikation 2: (Posterbeitrag) **Kim, J.**, Artuc, M., Zuberbier, T., Förster-Ruhrmann, U., Olze, H.; *Anti-proliferative effect of histamine on squamous cell carcinoma of the skin and downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2*. In: Laryngo-Rhino-Otologie, S. 10462. Georg Thieme Verlag KG, 2018.

Beiträge im Einzelnen: Jonghui Kim war an der Studienplanung zusammen mit Prof. Zuberbier, Dr. Artuc und Prof. Olze maßgeblich mitbeteiligt. Herr Kim war für die Durchführung der gesamten experimentellen Arbeit zuständig. Außerdem erstellte Herr Kim den Posterentwurf und überarbeitete die Korrekturen der Co-Autoren.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Kim, J., Guhl, S., Babina, M., Zuberbier, T., Artuc, M.; Integration of the Human Dermal Mast Cell into the Organotypic Co-culture Skin Model. *Basophils and Mast Cells* (Herausgeber: Gibbs, B. F., Falcone, F. H.), S. 69–85. Springer New York, 2014.

Kim, J., Artuc, M., Zuberbier, T., Förster-Ruhrmann, U., Olze, H.; Anti-proliferative effect of histamine on squamous cell carcinoma of the skin and downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2. In: *Laryngo-Rhino-Otologie*, S. 10462. Georg Thieme Verlag KG, 2018.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Metin Artuc für seine geduldige und hervorragende Betreuung während der gesamten Dissertation.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Torsten Zuberbier für sein Vertrauen und seine Unterstützung.

Last, not least danke ich herzlich meinen Eltern und meiner Frau für ihre Liebe und ihre beständige Unterstützung.