

Abschlussbericht der Teilprojekte 1B (WP1B) und 4A (WP4A) des Forschungsverbundes Medizinische Systembiologie - MedSys Chronic Wounds

FKZ 0315401B

Principle Investigators

PD. Dr. Niels Grabe

Tissue Imaging & Analysis Center
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 267
69120 Heidelberg

Tel: +49-6221-5451455

Mail: niels.grabe@bioquant.uni-heidelberg.de

I. Kurze Darstellung des Projektes

1. Aufgabenstellung

Chronische, schlecht heilende Wunden stellen weltweit ein immer größer werdendes sozio-ökonomisches Problem dar, das überwiegend bei älteren Patienten auftritt. Unterschiedlichen Schätzungen zufolge leiden alleine in der Bundesrepublik Deutschland ca. 3-5 Millionen Menschen unter chronischen Wunden. Die Inzidenz dieser Erkrankung steigt stetig an, was vor allem auf die zunehmende Alterung der Bevölkerung zurück zu führen ist. Die Wahrscheinlichkeit an einer chronischen Wunde zu erkranken beträgt in den westlichen Industrienationen ca. 1-2%; jenseits des 80. Lebensjahres steigt die Inzidenz sogar auf 4-5% (Mekkes et al., 2003). Die Gesamtkosten für Therapien betragen über 3 Milliarden Euro jährlich und belasten somit das Gesundheitswesen deutlich (Pelka, 1997).

Die Reepithelialisierung der Wunde durch Keratinozyten stellt durch die Wiederherstellung der Haut-Barrierefunktion und die damit einhergehende Abwehr potentieller Pathogene sowie den Rückhalt körpereigener Flüssigkeiten einen essentiellen Teil der Wundheilung dar (Gurtner et al., 2008). Seit mehr als 40 Jahren werden in der Literatur kontroverse Mechanismen diskutiert, welche die Reepithelialisierung und die damit einhergehende Bildung einer epidermalen Migrationszunge postulieren (Usui et al., 2005; Laplante et al., 2001; Radice, 1980). Die diskutierten Mechanismen lassen hierbei die kollektive Zellmigration als möglichen Einflussfaktor sowie insbesondere die unverwundeten Regionen während der Reepithelialisierung vollkommen außer Acht. Nur durch eine systembiologische Betrachtungsweise können hier fundamental neue Einsichten gewonnen werden.

Im Rahmen des MedSys-Konsortiums ‚Chronic Wounds - Medical Systems Biology of Chronic Wounds‘ wurde im Rahmen des Arbeitsprogramms 4A (Workpackage 4A, WP4A) ein organotypisches Wundheilungsmodell etabliert welches reproduzierbare, *in vivo* ähnliche Wundheilungsszenarien ermöglichte. Auf Basis dieses Modells erfolgte die Analyse der Reepithelialisierung aus einer systembiologischen Perspektive und führten zu einem neuen Reepithelialisierungsmechanismus, der Proliferation sowie kollektive

Zellmigration als essentielle Faktoren in sich vereint. Der beschriebene Reepithelialisierungsmechanismus konnte im Rahmen des WP1B in einem Multi-Agenten-Modell *in silico* reproduziert und durch experimentelle Perturbation mittels synthetischer Peptiden verifiziert werden.

2. Voraussetzungen für die Projektdurchführung

Nach Prüfung der Literaturlage und sorgfältiger Sichtung möglicher Techniken sowie der Diskussion mit den Konsortiumspartnern, haben wir uns im Rahmen des WP4A zur Etablierung eines „*punch-wound models*“ auf Basis kommerziell verfügbarer Haut-Gewebemodelle, entschieden. Die Durchführung der Experimente erfolgte in den Laboren des Tissue Imaging and Analysis Center, einer kooperativen Struktur des Institutes der Pathologie, des Institutes für Medizininformatik und Biometrie sowie des Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen (NCT).

3. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Frage des biomechanischen Mechanismus der Reepithelialisierung war seit über 40 Jahren ungeklärt. Vereinzelt wurden in der Literatur Mechanismen postuliert (Usui et al., 2005; Laplante et al., 2001; Radice, 1980), eine geschlossene systembiologische Modell fehlte bisher. Wesentliche Ursache hierfür war das Fehlen einer integrativen Analyse die ein entsprechendes experimentelles 3D Zellkulturmodell mit einer entsprechend passenden Auswertung so kombiniert, dass zelluläre Bewegungsmuster aufgelöst und vermessen werden könne. Ausgehend von publizierten Protokollen, wurden in WP4B daher organotypische Wundheilungsmodelle auf Basis kommerziell verfügbarer Hautkulturen etabliert. Um eine reproduzierbare Verwundung zu gewährleisten wurde nach eingehender Literaturrecherche die Methodik der *Punch*-Biopsie gewählt und erfolgreich durchgeführt. Um die standardisierte Auswertung der Wundheilung zu ermöglichen wurden eine teilautomatische, standardisierte Analysepipeline aufgebaut, bestehend aus 1) vollautomatisierter immunhistochemischer Färbung mittels Bond-Max-System, 2) Digitalisierung der Gewebeschnitte durch die digitale Mikroskopieplattform Nanozoomer und 3) durch vollautomatisierte, objektive Analyse mittels Bildverarbeitungssoftware. Somit konnten erstmals systembiologische Wundheilungskinetiken zur bisher ungelösten Frage der Reepithelialisierung erstellt werden. Die Kinetiken der Reepithelialisierung zugrunde liegenden Wachstumsfaktoren und Zytokine wurden mit einem Multiplex-Ansatz auf Basis der Luminex-Plattform erfasst.

4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Durch die interdisziplinäre Struktur der Arbeitsgruppe war eine optimale Verzahnung der WP4A und WP1B und der damit einhergehende Austausch von Expertise gegeben. Bei den monatlichen Treffen des Konsortiums wurden die experimentellen Resultate detailliert präsentiert und diskutiert. Darüber hinaus wurde bei zahlreichen außerplanmäßigen Kooperationstreffen das weitere technische/experimentelle Vorgehen adaptiert (Treffen erfolgten in Heidelberg (Pathologie, DKFZ) und Freiburg (FRIAS)).

II. Eingehende Darstellung

Die Unterpunkte 1., 2., 3 und 4. werden im folgenden Abschnitt zusammen gefasst

Durch die Projektförderung konnte die Finanzierung der notwendigen Sachmittel, sowie die Einstellung der nachfolgend aufgelisteten wissenschaftlicher Mitarbeiter für den Förderzeitraum ermöglicht werden:

A) WP1B

- Pommerencke, Thora (11/2009 – 10/2010)
- Lahrmann, Bernd (11/2009 – 10/2012)
- Dr. Guziolowski, Carito (11/2009 – 10/2012)
- Sütterlin, Thomas (06-08/2009 + 07-12/2012)

B) WP4A

- Safferling, Kai (02/2010 – 12/2012)
- Dr. Linde, Nina (01/2012 – 06/2012)
- Dr. Hernandez, Sergio (11/2009 – 10/2011)

Darstellung des Teilprojektes 4A (WP4A)

1. Etablierung des organotypischen in vitro Wundheilungsmodells

Ziel dieses Projektpunktes war die Etablierung eines standardisierten organotypischen *in vitro* Wundheilungsmodells, auf Basis kommerziell verfügbarer *Epiderm full thickness* (EFT) Kulturen, welches eine reproduzierbare Wundheilung ermöglichte. Zur Etablierung der Verwundungstechnik wurden zunächst verschiedene Test-Wundapplikationen mittels Skalpell, Nd³⁺-Yag-Lasers sowie verschiedenen Stanzmethoden durchgeführt. Die exzisionale Stanzmethodik mittels Einweg-Biopsiestanzen erwies sich als reproduzierbar und lieferte für die nachfolgende histologische Analyse darüber hinaus ausreichend große Wundareale, sodass wir diese Methode als Standardverwundung unseres *in vitro* Modells definierten. Die equilibrierten EFT-Kulturen wurden mittels Skalpell aus den Inserts herausgeschnitten und mit einer zirkulären Biopsiestanze verwundet (Abb. 1). In Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung wurde entweder eine zweifache konzentrische Verwundung mittels 2 mm Stanze oder eine einfache Verwundung mittels 3 mm Stanze appliziert. Für die Quantifizierung der Reepithelialisierungs- und Proliferationskinetik wurde die 2 mm Verwundungsstrategie gewählt, da durch eine erhöhte Datenakquisition die Modelleigenschaften mit *in vivo* Daten, als Grundlage für das weitere Vorgehen, verglichen werden konnten. Für die Analyse des Reepithelialisierungsmechanismus wurde die 3 mm Verwundungsstrategie gewählt, so dass ein größeres Wundareal zur Verfügung stand um die individuellen Keratinozytenbewegungen in der sich neubildenden EET verfolgen zu können. Es ist hervorzuheben, dass neben den hier beschriebenen Analysen zur Aufklärung des Reepithelialisierungsmechanismus, die generierten Proben für alle Projekte im MedSyskonsortium zur Verfügung standen und auch für Publikationen genutzt wurden (z.B. Schmitt et al., (2013) PlosOne).

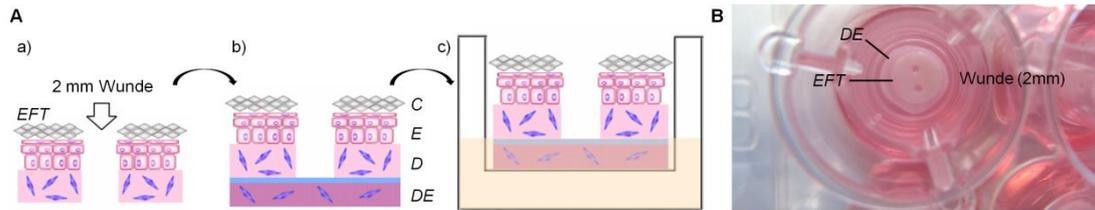


Abb. 1: Zusammenbau des organotypischen *in vitro* Wundheilungsmodells.

(A) Schematische Darstellung der Wundheilungsmodell Assemblierung. Organotypische EFT Kulturen wurden mit einer Biopsi stanze exzisional verwundet und auf ein zelluläres dermales Äquivalent (*dermal equivalent*, DE) transferiert. (B) Zweifach verwundetes organotypisches Wundheilungsmodell in einem Well einer 12-Well Platte. C=Stratum Corneum, E=Epidermis, D=Dermis.

Die etablierten organotypischen Wundheilungsmodelle wurden für Kinetiken von bis zu 10 Tagen eingesetzt. Die feingeweblichen Schnittpräparate zeichneten sich durch eine herausragende, physiologische Morphologie sowie ein gut identifizierbares Wundareal aus, welches die Quantifizierung und die Analyse der Reepithelialisierung ermöglichte (Abb. 2)

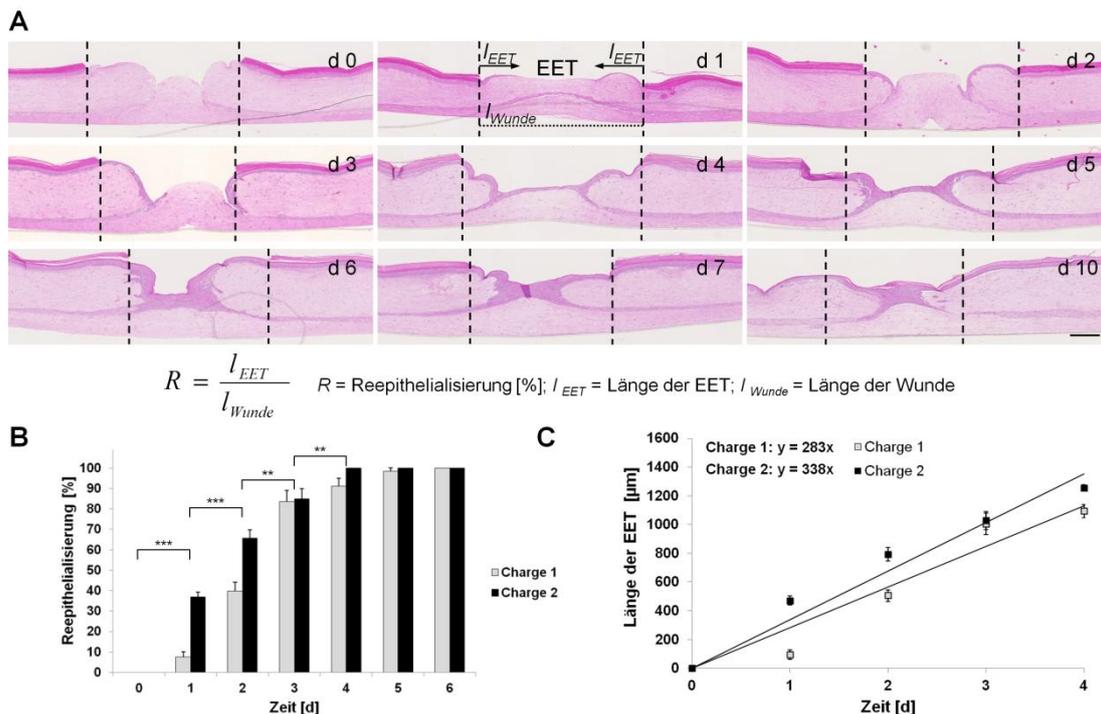


Abb. 2: Quantifizierung der Reepithelialisierung organotypischer Wundheilungsmodelle.

(A) Die Hämatoxylin-Eosin Färbung organotypischer Wundheilungsmodelle zeigt die Reepithelialisierung des Wundareals während einer 10-tägigen Kinetik. Die Reepithelialisierung ist durch die Formation einer EET und, nach Wundschluss, durch die Bildung eines mehrschichtigen Epithels gekennzeichnet. (B) Der relative Wundschluss wurde als Quotient aus der Länge der EET (l_{EET}) und der Länge des Wundareals (l_{Wunde}) gebildet. (C) Zur Ermittlung der Reepithelialisierungsraten wurde die Länge der EET gemessen und über die Zeit aufgetragen. Daten: Mittelwerte \pm SEM, $n = 4$. Im Gesamten wurden 55 histologische Feinschnittpräparate analysiert. Die gestichelten Linien markieren den Wundrand. Maßstabsbalken 500 μ m.

2. Aufklärung des Reepithelialisierungsmechanismus

Um ein konsistentes Erklärungsmodell kutaner Reepithelialisierung zu entwickeln wurde die Keratinozyten-Proliferation, Migration und Differenzierung unter Wundheilungsbedingungen analysiert, sowie der Einfluss der jeweiligen Prozesse auf die Reepithelialisierung untersucht.

Hierbei wurde ein zeitlich und räumlich aufgetrenntes Proliferationsprofil der Keratinozyten erstellt: Histologische Schnitte der Wundheilungskulturen wurden in jeweils 10 Regionen (gleichbedeutend mit 5 Konzentrischen Ringen) eingeteilt und die proliferative Aktivität der Basalzellen in jeder Region bestimmt (Abb. 3).

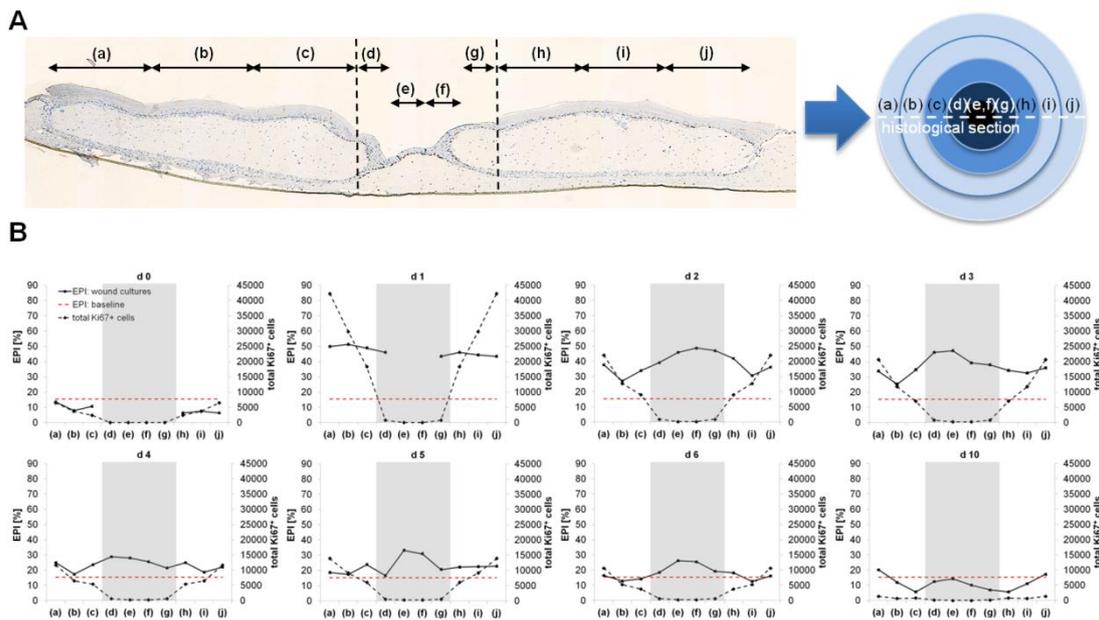


Abb. 3: Bildanalytische Auswertung des Proliferationsmarkers Ki67 zur Erstellung eines Proliferationsprofils organotypischer Wundheilungsmodelle.

(A) Ki67 gefärbte histologische Präparate organotypischer Kulturen wurden in 10 Regionen (= 5 konzentrische Ringe) eingeteilt: a, b, c, h, i, j = unverwundete Regionen; d-g = Wunde. (B) Der epidermale Proliferationsindex, sowie die Gesamtanzahl an proliferierenden Ki67⁺ Basalzellen wurden in räumlicher und zeitlicher Abhängigkeit aufgetragen.

Die Proliferationsanalyse ergab einen anfänglichen Proliferationsimpuls der einen Tag nach Verwundung einsetzte. Diese proliferative Aktivität verlagerte sich im Laufe der Kinetik wellenförmig von den unverwundeten Regionen in das Wundareal und erzeugte damit einen Strom neu generierter Keratinozyten, welcher aus den unverwundeten Bereichen in das Wundareal migrierte.

Während dieser Migration hielten die Keratinozyten ihre Zell-Zell Kontakte in Form von Desmosomen (Dsg1), *tight junctions* (Occludin) und Adhärenzverbindungen (E- und P-cadherin) aufrecht. Darüber hinaus zeigte die räumliche Verteilung der Zellverbindungen eine Kompartimentalisierung der sich bildende Zellzone in a) ein suprabasales, starres Kompartiment, welches von Desmosomen und *tight junctions* geprägt war und b) ein durch Adhärenzverbindungen geprägtes, migratorisch flexibles basales Kompartiment (Abb.4).

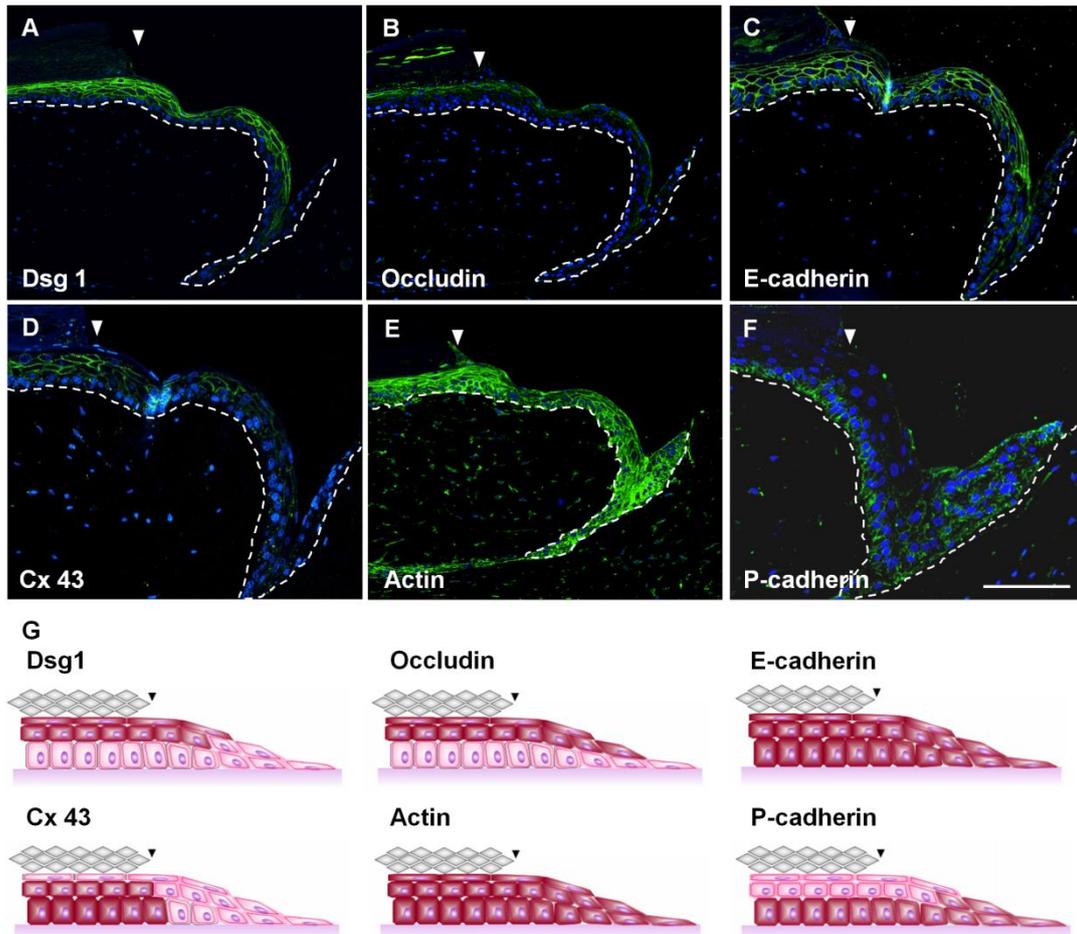


Abb. 4: Räumliche Organisation der Zell-Zell Verbindungen in der sich bildenden Zellwunde. Histologische Feinschnittpräparate zeigen die räumliche Expression von (A) Desmoglein 1, (B) Occludin, (C) E-cadherin, (D) Connexin 43 (Cx 43), (E) Aktin und (F) P-cadherin. Die jeweiligen räumlichen Expressionsmuster der Zell-Zell-Verbindungen sind schematisch in (G) dargestellt.

In der Literatur weist die Aufrechterhaltung der Zell-Zell Verbindungen auf eine kollektive Migration der in die Wunde strömenden Keratinozyten hin (Friedl and Gilmour, 2009). Kollektive Migration setzt darüber hinaus eine übergeordnete Zellpolarisation voraus (Friedl et al., 2011). Wir konnten durch die Analyse der Zellkerne sowie eines Polaritätsmarkers (Golga2) diese übergeordnete Polarisierung der Keratinozyten während der Reepithelialisierung zeigen und die Hypothese kollektiver Zellmigration unter Wundheilungsbedingungen bestätigen (Abb.5).

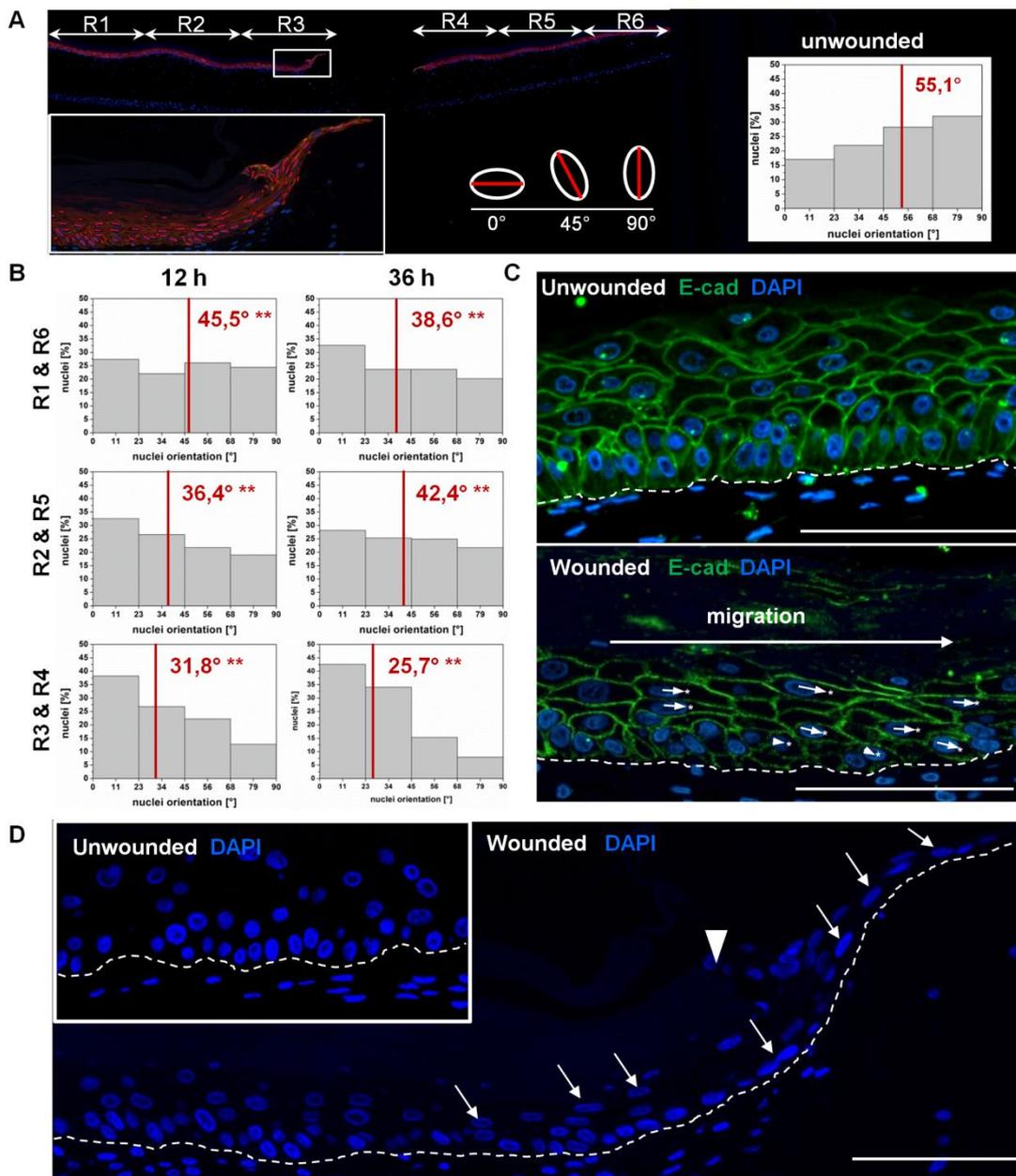


Abb. 5: Übergeordnete Polarisation als Kennzeichen kollektiv migrierender basaler Keratinozyten.

(A) Histologische Präparate organotypischer Kulturen wurden in 6 Regionen, jeweils in Abhängigkeit zu dem Abstand zur Wunde eingeteilt und die Rotation der nukleären Längsachse im Bezug zur Basallamina gemessen. (B) Auftragung der Änderung der nukleären Längsachsen. Nach Verwundung ist eine signifikante Rotationsänderung der Zellkerne von senkrecht angeordneten (55,1° bei unverwundeten Kulturen) hin zu waagrecht angeordneten (25,7° 36 h nach Verwundung) Nuclei zu verzeichnen.

Mittels eines von uns etablierten zweistufigen Fluoreszenzexperimentes war es uns möglich basale Keratinozyten als treibende Kraft kollektiver Zellmigration zu identifizieren. Die Ergebnisse führten zu dem von uns beschriebenen Reepithelisierungsmechanismus des *extending shields* (Abb. 6). Hierbei bilden die starren, suprabasalen Keratinozyten ein mechanisch stabiles Kompartiment aus unter welchem die basalen Keratinozyten mittels kollektiver Zellmigration in das Wundareal einwandern um die Zellzunge zu verlängern und letztendlich zu einem Wundschluss

führen (Abb. 6B). Die signifikant ansteigende Proliferation stellt hierfür genügend neue Keratinozyten bereit, um den Zellstrom welcher für die Verlängerung der Zellzunge benötigt wird zu gewährleisten. Das zweistufige Fluoreszenzexperiment zeigte, dass die in die Wunde einströmenden basalen Keratinozyten die vorangegangenen basalen Zellen aktiv durch einen *lifting*-Mechanismus aus dem basalen in das suprabasale Kompartiment heben, um das Schild aus Suprabasalzellen zu verlängern (Abb. 6C-F). Für die Verlängerung dieses Schildes sind die tight junctions essentiell. Wir konnten dies in einem Pertubationsversuch belegen. Hierbei setzten wir ein Peptid ein, welches die B-Schleife des *tight junction* Proteins Occludin emulierte. Die Blockade der Occludin-Bindestellen führte zu einer Abschilferung der Keratinozyten und die damit einhergehende Inhibition der Keratinozytenintegration in die sich verlängernde Zellzunge zu einer Störung des *extending shield* Mechanismus (Abb. 6F).

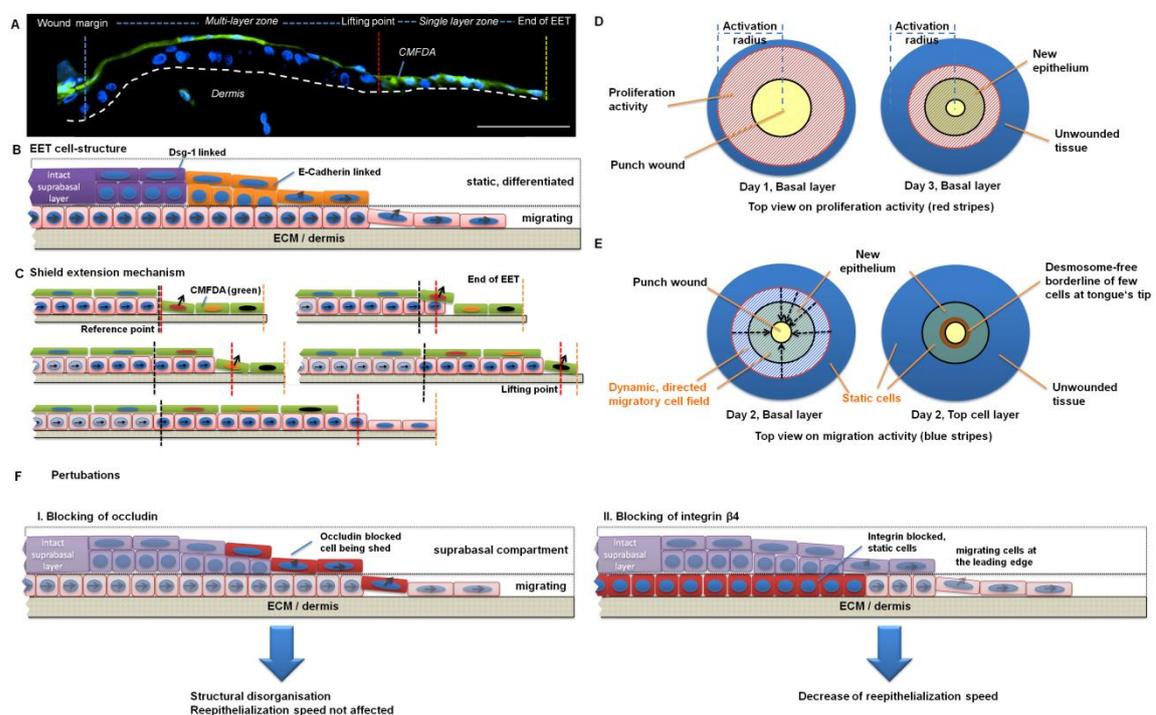


Abb. 6: Der *Extending-Shield*-Reepithelisierungsmechanismus basierend auf kollektiv migrierenden, basalen Keratinozyten.

(A) Die Ergebnisse des zweistufigen Fluoreszenzexperimentes zeigen das durch Zelltracker angefärbte Keratinozyten immer in das suprabasale Kompartiment geschoben werden. Die sich ausbildende Zellzunge (*extending epidermal tongue*, EET) weist hierbei eine trianguläre Struktur, bestehend aus einer mehrlagigen Schicht am Wundrand und einer Einzelzellschicht an der Migrationsfront, auf. (B) Die suprabasalen Zellen formen in der sich ausbildenden EET ein starres, mechanisch stabiles Kompartiment (=shield) welches die darunter migrierenden basalen Keratinozyten vor schädlichen äußeren Einflüssen schützt. (C) Bei der Verlängerung der Zellzunge werden durch einen *lifting*-Mechanismus basale Zellen von nachrückenden, in die Wunde einwandernden Basalzellen in das suprabasale Kompartiment gehoben um den „Schutzschild“ zu verlängern. (D) Die erhöhte proliferative Aktivität des umliegenden Gewebes, bzw. der Zellen in der Zellzunge sorgen für einen ausreichend hohen Nachschub an Keratinozyten um eine vollständige Reepithelialisierung zu gewährleisten. (E) Diese neu generierten Zellen wandern durch kollektive Migration in die Wunde ein. (F) Die von uns durchgeführten Perturbationsexperimente zur Blockierung des *tight junction* Protein Occludin zeigen eine Störung des *Extending-Shield*-Mechanismus durch Abschilferung und einhergehender Integrationsinhibition der Keratinozyten.

3. Epidermale-Dermale Interaktion während der Wundheilung

Um eine erfolgreiche, vollständige Reepithelialisierung des Wundareals zu gewährleisten müssen die verschiedensten zellulären Prozesse (Proliferation, Migration, Differenzierung) koordiniert werden. Durch Multiplex-Analysen der Überstände der Wundheilungskulturen konnten wir die epidermale-dermale Interaktion zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0,1,3 nach Verwundung) während der Wundheilung aufklären und das zugrundeliegende parakrine Netzwerk darstellen (Abb. 7).

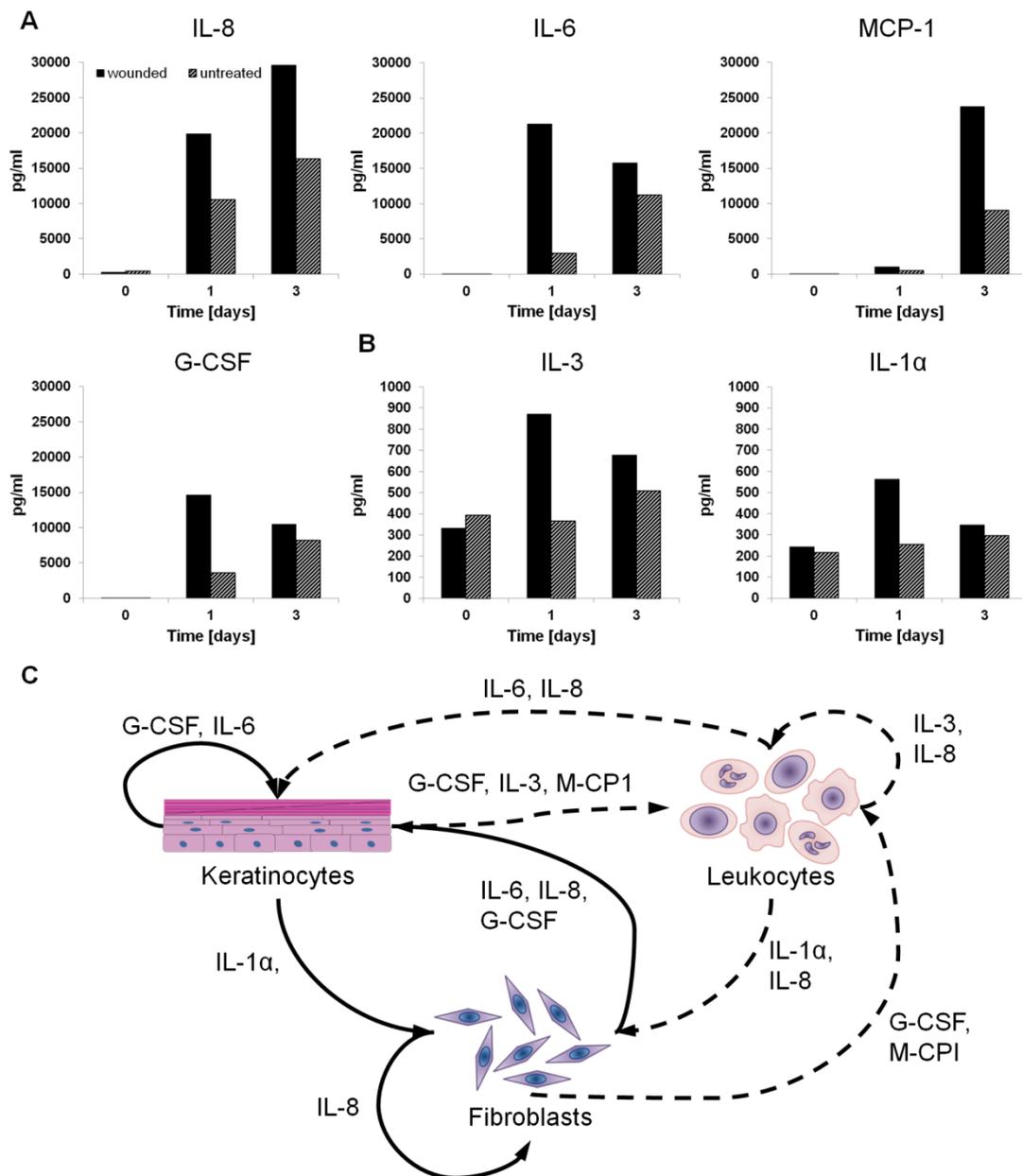


Abb. 7: Netzwerk der parakrinen Signaltransduktion zwischen Keratinozyten und Fibroblasten in einem exzisional verwundeten organotypischen *in vitro* Wundheilungsmodell.

Mittelwerte der gemessenen Zytokine. In Abhängigkeit ihrer Konzentration wurden die Zytokine in zwei Gruppen eingeteilt: **(A)** > 10 000 pg/ml; **(B)** < 1000 pg/ml. Das parakrine Netzwerk ist in **(C)** dargestellt

Tab. 1: Übersicht der im organotypischen *in vitro* Wundheilungsmodell auftretenden Zytokine.

Aufgelistet sind die im parakrinen Signaltransduktionsnetzwerk befindlichen Zytokine des organotypischen *in vitro* Wundheilungsmodells. (Grose and Werner, 2003; Werner et al., 2007; McKay and Leigh, 1991; Schroeder et al., 2009; Grossman et al., 1989; Rennekampff et al., 2000; Gillitzer and Goebeler, 2001; Boxman et al., 1996; Yadav et al., 2010; Kaushansky et al., 1988; Kawada et al., 1997; Mansbridge et al., 1999; Mueller and Fusenig, 1999).

Cytokine	Secreted by	Effect	Literature
IL-1 α	Fibroblasts, Neutrophils	Induction of KGF (Keratinocytes), FGF (Fibroblasts)	Werner and Grose, 2003; Werner et al., 2007
IL-3	Keratinocytes, Basophils	Basophil activation	McKay and Leigh, 1991; Schroeder et al., 2009
IL-6	Keratinocytes, Fibroblasts, Macrophages	Keratinocyte mitogen, motogen	Werner and Grose, 2003; Werner et al., 2007; Grossman et al., 1989
IL-8	Keratinocytes, Fibroblasts, Polymorphonuclear cells	Keratinocyte mitogen, Fibroblast motogen	Werner and Grose, 2003; Rennekampff et al., 2000; Gillitzer and Goebeler, 2001; Boxman et al., 1996
MCP-1	Keratinocytes, Fibroblasts, Macrophages	Monocyte attractant	Werner and Grose, 2003; Yadav et al., 2010
G-CSF	Keratinocytes, Fibroblasts	Keratinocyte and Fibroblast mitogen, motogen	Kaushansky et al., 1988; Kawada et al., 1997; Mansbridge et al., 1999; Mueller and Fusenig, 1999

Die Ergebnisse der epidermalen Migrationsanalyse, der daraus resultierende *Extending-Shield*-Reepithelisierungsmechanismus, sowie die intrazelluläre Kommunikation mittels Zytokinen und Wachstumsfaktoren wurden in einer Publikation zusammengefasst und befinden sich derzeit bei dem *Journal of Cell Biology* in re-Revision.

Projektbezogene Publikationen und Präsentationen des Teilprojektes 4A

1. Eigene Manuskripte

- Safferling, K., Sütterlin, T., Westphal, K., Ernst, C., Breuhahn, K., James, M., Jäger, D., Halama, N., Grabe, N. (Re-Revision). Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by *in vitro* and *in silico* models. Akzeptiert im *Journal of Cell Biology* 2013
- Schmitt, S., Safferling, K., Westphal, K., Hrabowski, M., Müller, U., Angel, P., Wiechert, L., Ehemann, V., Müller, B., Holland-Cunz, S., Stichel, D., Harder, N., Rohr, K., Germann, G., Matthäus, F., Schirmacher, P., Grabe, N., Breuhahn, K. (2013). Stathmin regulates keratinocyte proliferation and migration during cutaneous regeneration. *PLoS One*. 8:1-15.
- Pommerencke, T., Westphal, K., Ernst, C., Safferling, K., Dickhaus, H., Steinberg, T., Tomakidi, P., et al. (2010). Spatial quantification and classification of skin response following perturbation using organotypic skin cultures. *Bioinformatics*, 26(21), 2760–2766.

2. Posterpräsentationen und Vorträge

Vorträge:

- Safferling K, Westphal K. Every cell counts – Quantification of the reepithelialization process in human wound healing. World conference on regenerative medicine. Leipzig, Germany 2011

Konferenzbände:

- Safferling K, Westphal K, Guziolowski C, Halama N, Grabe N. Dermal-Epidermal Cross-talk: Quantification of Proliferation in Wound Healing using a 3D *in vitro* Model. Journal of Investigative Dermatology 131 (Supplement 2S), 2011
- Schmitt S, Westphal K, Safferling K, Hrabowski M, Germann G, Holland-Cunz S, Angel P, Schirmacher P, Grabe N, Breuhahn K. Identification of Growth Factor-induced Mechanisms Regulating Epithelial Cell Proliferation in Cutaneous Wound Healing. Journal of Investigative Dermatology 131 (Supplement 2S), 2011
- Hernandez S, Westphal K, Safferling K, Ernst C, Hayden P, Grabe N. Time-series microarrays experiments to study skin irritation: towards a system biology approach. Conference on Systems Biology of Mammalian Cells – SBMC. Freiburg, Germany 2010.
- Westphal K, Safferling K, Ernst C, Grabe H, Hayden P, Grabe N. Quantification of cell streams in epidermal wound healing using 3D *in vitro* cultures of human skin and whole-slide imaging. Conference on Systems Biology of Mammalian Cells – SBMC. Freiburg, Germany 2010.
- Grabe N, Westphal K, Safferling K, Ernst C, Grabe H, Sütterlin T, Halama N. Towards an Automated Platform for Researching the Homeostasis of Epithelial Tissue. Goryanin, Igor; Goryachev, Andrew (Eds.). Advances in Systems Biology: Proceedings of the 11th International Conference on Systems Biology. Springer(2011), 1st Edition. ISBN: 978-1-4419-7209-5.

Poster:

- Niels Grabe, Kai Safferling, Kathi Westphal, Carito Guziolowski, Aristotelis Kittas, Claudia Ernst, Niels Halama, Dirk Jaeger. Understanding cancer invasion by the systems biological analysis of collective cell migration in 3D tissue models. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting. Chicago, United States 2012. (Poster)
- May A, Schmitt S, Westphal K, Füssel B, Angel P, Germann G, Haas U, Riedel K, Hrabowski M, Böttcher M, Busch H, Safferling K, Schirmacher P, Grabe N, Breuhahn K. Identification of a growth factor-induced gene network regulating epithelial cell migration in cutaneous wound healing. Conference on Systems Biology of Mammalian Cells, 2010 (Poster)

Darstellung des Teilprojektes 1B (WP1B)

1. Erweiterung und Evaluation der Modellierungs- und Simulationsumgebung (EPISIM)

Die Modellierungs- und Simulationsplattform EPISIM erlaubt das Erstellen von multizellulären Zellverhaltensmodellen (CBMs) mittels einer grafischen Modellierungssprache. In einem CBM wird mittels Prozessdiagrammen entweder stochastisch, deterministisch oder hybrid modelliert, unter welchen Bedingungen

eine Zelle in einen der grundlegenden Zellzustände Proliferation, Migration, Differenzierung oder Zelltod übergeht. Diese grafischen CBMs können dynamisch an quantitative subzelluläre Modelle gekoppelt werden, die in dem Modellierungsstandard Systems Biology Markup Language (SBML) vorliegen (Abb.8). Mittels EPISIM lassen sich somit effizient multizelluläre Modelle auf der Zellebene mit biochemischen oder genregulatorischen Netzwerken auf der Subzelebene semantisch zu einem multiskalierten Modell verknüpfen. Ein solches (multiskaliertes) Zellverhaltensmodell ist wiederum an ein biomechanisches Modell (BM) gekoppelt, das von der in EPISIM integrierten, Simulationsplattform bereitgestellt wird. Ein BM umfasst alle räumlichen Aspekte eines multizellulären (Gewebe-)Modells wie bspw. die Zellmorphologie oder interzelluläre Kräfte wie Druck oder Zelladhäsion. Insgesamt bilden BM, CBM und SBML basierte Modelle ein multiskaliertes multizelluläres Gewebemodell, das von der Multiagenten-basierten Simulationsumgebung der EPISIM Plattform quantitativ simuliert werden kann. Zu diesem Zweck werden die grafischen CBMs mittels des für EPISIM entwickelten Codegenerators in ausführbaren Simulationscode übersetzt, der von der Simulationsumgebung geladen und dynamisch in die Multiagenten-basierte Simulation integriert wird, in der eine Zelle einem Agenten entspricht.

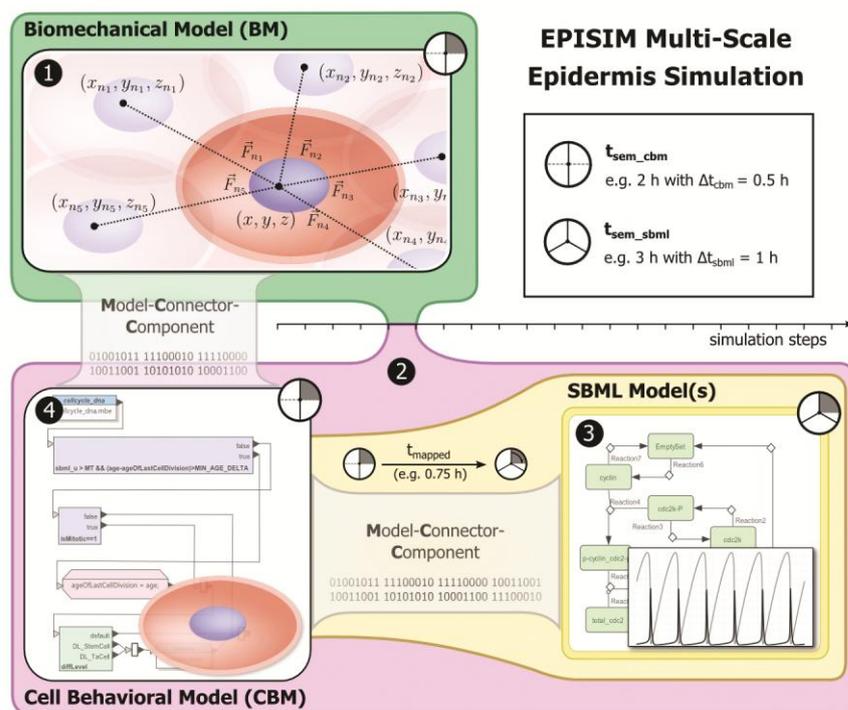


Abb. 8: Multiskaliertes, multizelluläres Gewebemodell bestehend aus den Komponenten Zellverhaltensmodell (CBM), biomechanisches Modell (BM) und quantitativen subzellulären Modellen (SBML Modelle).

Ein Zellverhaltensmodell beschreibt mittel grafischen Prozessdiagrammen den Übergang einer Zellen zwischen den grundlegenden Zellzuständen Proliferation, Migration, Differenzierung und Zelltod. Ein Zellverhaltensmodell ist an ein biomechanisches Modell gekoppelt, das alle räumlichen Zellaspekte wie bspw. Zellmorphologie oder interzelluläre Kräfte abbildet. Genregulatorische bzw. biochemische Netzwerke, die als SBML basiertes Modell vorliegen, können semantisch in ein Zellverhaltensmodell integriert werden. Die verschiedenen Simulationszeitskalen werden automatisch aufeinander abgebildet.

Im Rahmen des Projektes ist ein zweidimensionales sowie ein dreidimensionales biomechanisches Modell für die Wundheilung entwickelt und in die

Simulationsumgebung integriert worden. In diesem Modell werden Zellen räumlich durch Ellipsen (2D) bzw. durch Ellipsoide repräsentiert (Abb. 9). Zellen üben in Abhängigkeit von der Unterschreitung bzw. Überschreitung der optimalen Zelldistanz d_{opt} eine Kraft in Form von Druck oder Adhäsion auf unmittelbar benachbarte Zellen aus.

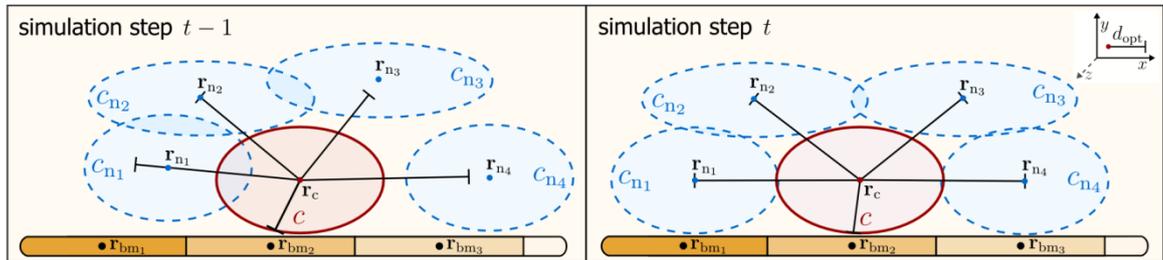


Abb. 9: Biomechanisches Modell.

Zellen werden in 2D durch Ellipsen und in 3D durch Ellipsoide räumlich repräsentiert. Zellen üben bei Unterschreitung der optimalen Zelldistanz d_{opt} Druck auf unmittelbar benachbarte Zellen (bspw. c_{n1}) aus. Analog werden direkt angrenzende Zellen aufgrund Zell-Zell-Adhäsion angezogen, sofern die optimale Zelldistanz in einem gewissen Rahmen überschritten wurde (bspw. c_{n3} u. c_{n4}).

Durch die Kopplung an ein Zellverhaltensmodell kann mit diesem biomechanischen Modell ein zelldifferenzierungsabhängiges Adhäsionsprofil bezogen auf die Nachbarzellen realisiert werden.

Als Anwendungsfall für die EPISIM Plattform und deren grafische Zellverhaltensmodellierungssprache im Allgemeinen und das zuvor beschriebene biomechanische Modell im Besonderen, ist ein *in silico* Modell der Reepithelialisierung akuter epidermaler Wunden realisiert worden.

2. *In silico* Modellierung des Reepithelialisierungsmechanismus

Um zu ermitteln, ob der postulierte die Verlängerung der Zellzunge erklären kann, entwickelten wir ein multizelluläres Gewebemodell bestehend aus Zellverhaltensmodell und biomechanischem Modell unter Verwendung der von uns entwickelten EPISIM Plattform (siehe oben).

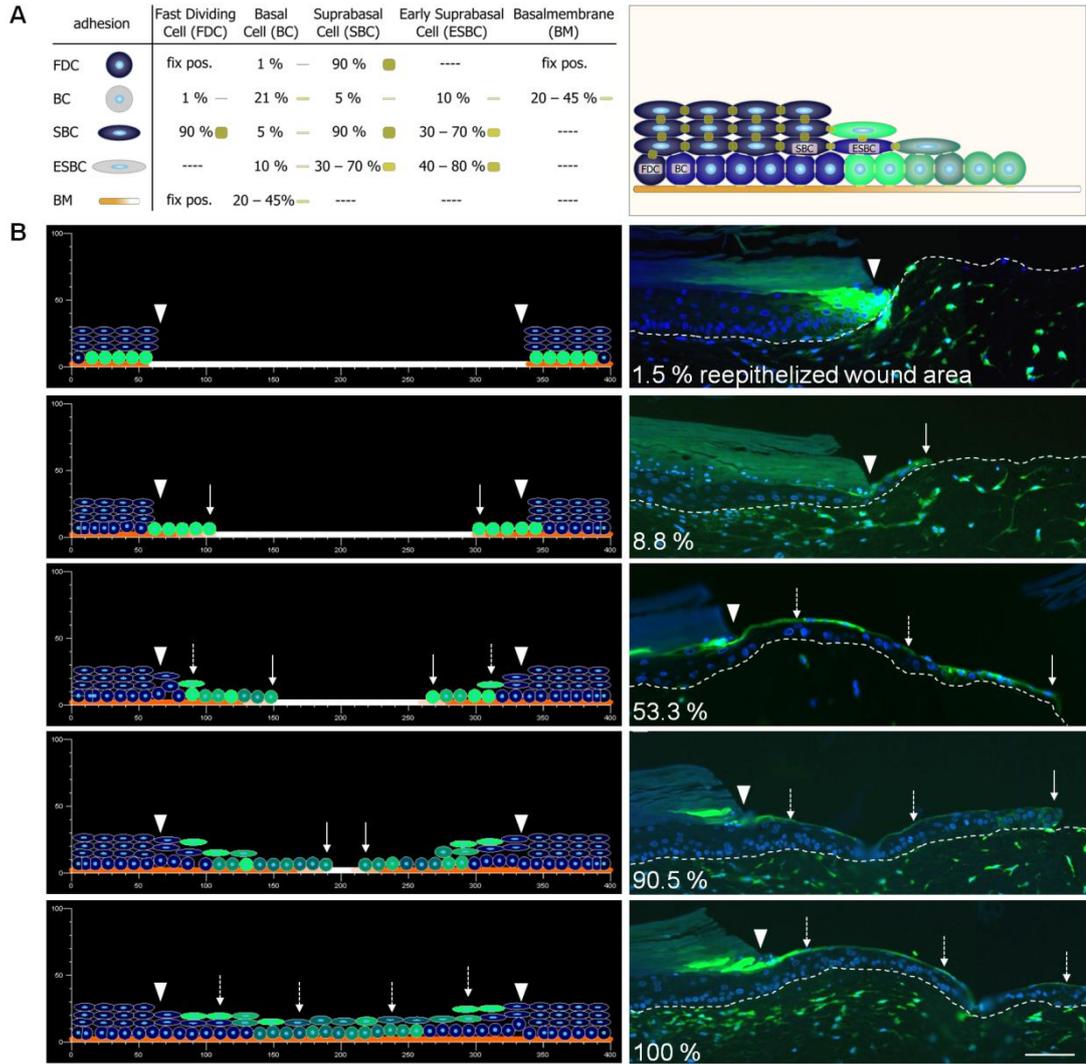


Abb. 10: *In silico* Modell und Simulation des *Extending-Shield*-Reepithelialisierungsmechanismus.

(A) Die EPISIM Plattform diente zur Modellierung des *Extending-Shield*-Reepithelialisierungsmechanismus. Das Modell enthält vier distinkte Zelltypen: (i) teilungsaktive Zellen, (ii) Basalzellen, (iii) Suprabasalzellen, (iv) frühe Suprabasalzellen mit jeweils individuellem Zelladhäsionsprofil (links). **(B)** Während des Simulationsprozesses bilden Keratinozyten die typische trianguläre Struktur der in das Wundareal einwandernden Zellzunge aus.

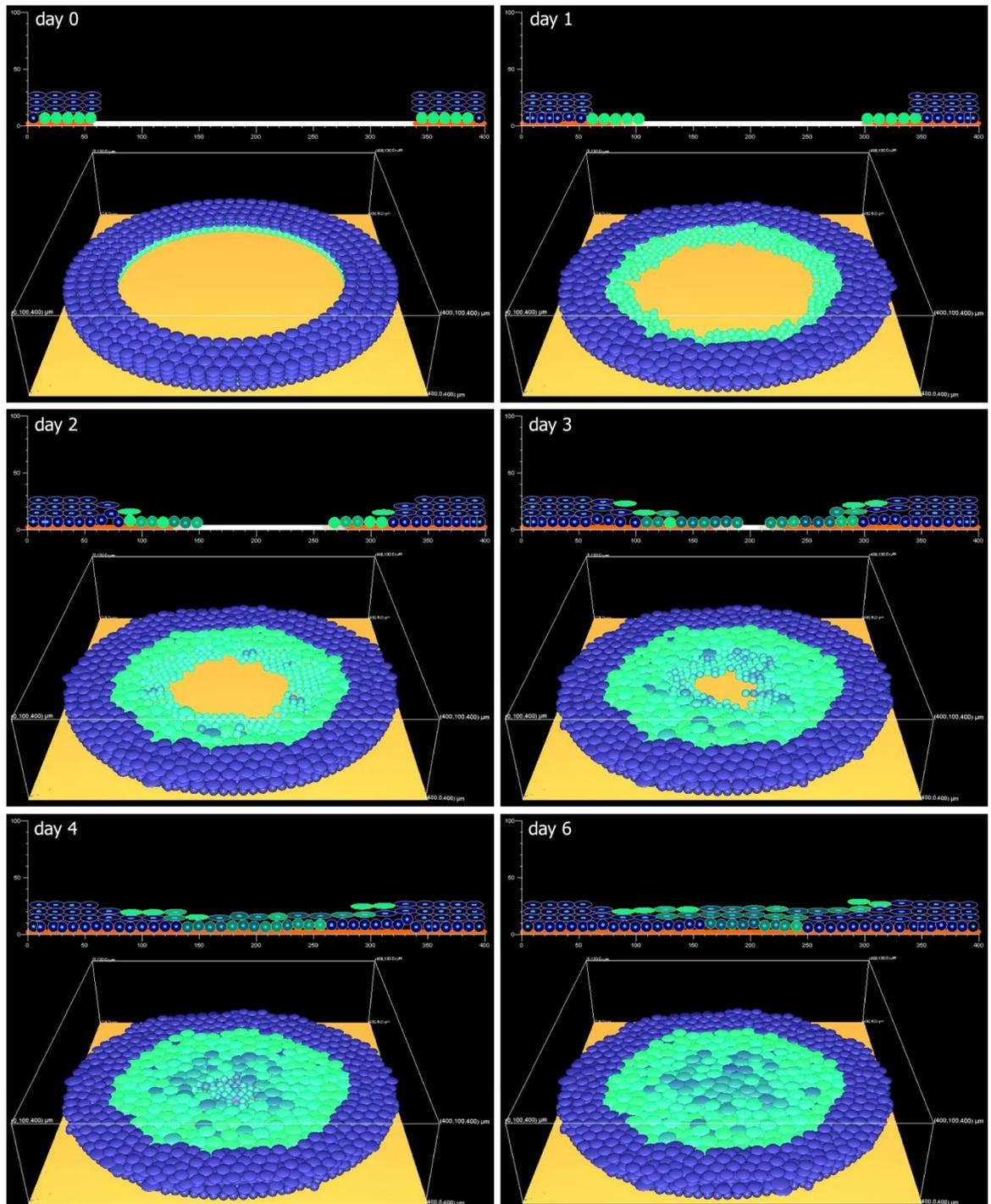


Abb. 11: 2D und 3D Simulation des *Extending-Shield-Reepithelialisierungs-*mechanismus.

Die Reepithelialisierung akuter epidermaler Wunden konnte im 2D als auch im 3D Modell übereinstimmend reproduziert werden.

Das *in silico* Modell des Reepithelialisierungsmechanismus enthielt hierbei vier distinkte Zelltypen: (i) teilungsaktive Zellen (*fast dividing cells*, FDC): teilungsaktive Zellen sind durch eine fixe Position innerhalb des Systems und durch eine erhöhte Teilungsrate, welche den Proliferationsimpuls direkt nach Verwundung simuliert, gekennzeichnet. (ii) Basalzellen (*basal cells*, BC): Basalzellen wandern auf der Basalmembran (BMb) in die Wunde ein. (iii) Suprabasalzellen (*suprabasal cells*, SBC): Suprabasalzellen sind Teil des unverwundeten Kompartiments und fungieren als initiales Schild unter welchem die Basalzellen wandern, um diesen Schild zu

verlängern. (iv) Frühe Suprabasalzellen (*early suprabasal cells*, ESBC): Wird eine Basalzelle von einer nachfolgenden Basalzelle in das suprabasale Kompartiment angehoben, dann differenziert sie zu einer frühen Suprabasalzelle. Jeder der vier Zelltypen besitzt ein individuelles Adhäsionsprofil. Das biomechanische Modell, das die Zell-Zell-Adhäsion abbildet wird hierbei vom Zellverhaltensmodell parametrisiert, das die Zelldifferenzierung und die damit einhergehende Veränderung des Zelladhäsionsprofils beinhaltet. Ferner ist ein Zellzyklus- und Proliferationsmodell Bestandteil des Zellverhaltensmodells.

Im Rahmen der Simulation des multizellulären *in silico* Gewebemodells ließen sich die *in vitro* Ergebnisse, bzw. der daraus resultierende *Extending-Shield*-Reepithelialisierungsmechanismus reproduzieren (Abb. 10 und Abb. 11).

Projektbezogene Publikationen und Präsentationen des Teilprojektes 1B

1. Eigene Manuskripte

- Safferling, K., Sütterlin, T., Westphal, K., Ernst, C., Breuhahn, K., James, M., Jäger, D., Halama, N., Grabe, N. (Re-Revision). Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by *in vitro* and *in silico* models. Re-Revision im Journal of Cell Biology
- Sütterlin T., Kolb C., Dickhaus H., Jäger D., Grabe N. Bridging the scales: semantic integration of quantitative SBML in graphical multi-cellular models and simulations with EPISIM and COPASI. Bioinformatics. 2013 Jan 15;29(2):223-9.
- Guziolowski C., Kittas A., Dittmann F., Grabe N. Automatically generating causal networks linking growth factor stimuli to functional cell state changes. FEBS Journal 2012, 279, 18:3462-74
- Sütterlin T., Huber S., Dickhaus H. and Grabe N. (2009) Modeling multi-cellular behavior in epidermal tissue homeostasis via finite state machines in multi-agent systems, Bioinformatics, 25, 2057-2063

2. Posterpräsentationen und Vorträge

Vortrag:

Sütterlin T., Dickhaus H., Grabe N. Automated model-driven generation of software components for the simulation of epithelial tissues. Biomedical Engineering (MECBME)., 2011 1st Middle East Conference on Biomedical Engineering, pp.275-278, 21-24 Feb. 2011, Sharjah, United Arab Emirates

Konferenzbände:

- Sütterlin T., Dickhaus H., Grabe N. Automated model-driven generation of software components for the simulation of epithelial tissues. Biomedical Engineering (MECBME)., 2011 1st Middle East Conference on Biomedical Engineering, pp.275-278, 21-24 Feb. 2011, Sharjah, United Arab Emirates
- Sütterlin T., Dickhaus H., Grabe N. Integration of a flexible polygon cell shape model in the EPISIM multi-agent platform for modelling and simulation of epithelial tissue homeostasis. Goryanin, Igor; Goryachev, Andrew (Eds.). Advances in Systems Biology: Proceedings of the 11th International Conference on Systems Biology. Springer (2011)
- Sütterlin T., Grabe N. Efficient Modeling of the Spatial Dynamics of Tissues by Automated Transformation of Graphical Cell Behavioral Models into Multi-Agent

Based Simulations. Proceedings of the 6th Workshop on Computation of Biochemical Pathways and Genetic Networks, BioQuant Heidelberg, Sept. 2010. Logos Verlag Berlin

- Sütterlin T., Dickhaus H, Grabe N. (2010). Cell based tissue modelling by a polygon shape model in a multi-agent environment for the simulation of epidermal wound healing. Conference on Systems Biology of Mammalian Cells – SBMC; Germany 2010
- Guziolowski, C., Hernandez, S., Grabe, N., "A Global Reaction Map of Signaling in Wound Healing", Conference on Systems Biology of Mammalian Cells – SBMC; Germany 2010

Poster:

- Sütterlin T., Dickhaus H, Grabe N. (2012). Putting the pieces together: Enhancing Multi-Scale Modeling with Automated Semantic Model Integration. Conference on Systems Biology of Mammalian Cells – SBMC; Leipzig, Germany 2012 (Poster)
- Sütterlin T., Dickhaus H, Grabe N. Multi-Scale Tissue Modeling: Semantic Integration of SBML Models in Multi-Cellular Simulations using the EPISIM Platform. Proceedings of the 12th International Conference on Systems Biology; Heidelberg/Mannheim, Germany (2011)
- Guziolowski, C., Dittmann, F., Grabe, N. Linking growth factor stimuli to cellular processes. Proceedings of the 12th International Conference on Systems Biology; Heidelberg/Mannheim, Germany (2011)
- Guziolowski, C., Dittmann, F., Grabe, N. High dimensional RNA data in protein networks?, Systems Biology of Human Disease, Boston, US, 2011

Referenzen

Boxman, I.L., C. Ruwhof, O.C. Boerman, C.W. Löwik, and M. Ponc. 1996. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch. Dermatol. Res.* 288:391–398.

Friedl, P., and D. Gilmour. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:445–457.

Friedl, P., K. Wolf, and J. Lammerding. 2011. Nuclear mechanics during cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 23:55–64.

Gillitzer, R., and M. Goebeler. 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.* 69:513–521.

Grose, R., and S. Werner. 2003. Wound healing studies in transgenic and knockout mice. A review. *Methods Mol. Med.* 78:191–216.

Grossman, R.M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kuppert, P.B. Sehgal, and A.B. Gottlieb. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:6367–6371.

Gurtner, G.C., S. Werner, Y. Barrandon, and M.T. Longaker. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature.* 453:314–321.

- Kaushansky, K., N. Lin, and J.W. Adamson. 1988. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J. Clin. Invest.* 81:92–97.
- Kawada, a, M. Hiruma, H. Noguchi, A. Ishibashi, K. Motoyoshi, and I. Kawada. 1997. Granulocyte and macrophage colony-stimulating factors stimulate proliferation of human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 289:600–602.
- Laplante, A.F., L. Germain, and O.I.S.A. Auger. 2001. Mechanisms of wound reepithelialization : hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J.* 15:2377–2389.
- Mansbridge, J.N., K. Liu, R.E. Pinney, R. Patch, A. Ratcliffe, and G.K. Naughton. 1999. Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers. *Diabetes Obes. Metab.* . 1:265–279.
- McKay, I. a, and I.M. Leigh. 1991. Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br. J. Dermatol.* . 124:513–518.
- Mekkes, J.R., M. a M. Loots, a C. Van Der Wal, and J.D. Bos. 2003. Causes, investigation and treatment of leg ulceration. *Br. J. Dermatol.* . 148:388–401.
- Mueller, M.M., and N.E. Fusenig. 1999. Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression. *Int. J. Cancer* . 83:780–789.
- Pelka, R. 1997. The economic situation of chronic wounds. *Krankenpflege J.* 35:338–343.
- Radice, G.P. 1980. The spreading of epithelial cells during wound closure in *Xenopus* Larvae. *Dev. Biol.* 46:26–46.
- Rennekampff, H.O., J.F. Hansbrough, V. Kiessig, C. Doré, M. Sticherling, and J.M. Schröder. 2000. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J. Surg. Res.* 93:41–54.
- Schroeder, J.T., K.L. Chichester, and A.P. Bieneman. 2009. Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *J. Immunol.* 182:2432–2438.
- Usui, M.L., R.A. Underwood, J.N. Mansbridge, L.A. Muffley, W.G. Carter, and J.E. Olerud. 2005. Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization. *Wound Repair. Regen.* . 13:468–479.
- Werner, S., T. Krieg, and H. Smola. 2007. Keratinocyte – fibroblast interactions in wound healing. *J. Inv. Dermatol.* 127:998–1008.
- Yadav, A., V. Saini, and S. Arora. 2010. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin. Chim. Acta.* 411:1570–1579.

Kurzfassung des Abschlussberichtes der Teilprojekte 1B (WP1B) und 4A (WP4A) des Forschungsverbundes Medizinische Systembiologie - *MedSys Chronic Wounds*

FKZ 0315401B

Principle Investigators

PD. Dr. Niels Grabe

Tissue Imaging & Analysis Center
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 267
69120 Heidelberg

Tel: +49-6221-5451455

Mail: niels.grabe@bioquant.uni-heidelberg.de

Chronische, schlecht heilende Wunden stellen weltweit ein immer größer werdendes sozio-ökonomisches Problem dar, das überwiegend bei älteren Patienten auftritt. Unterschiedlichen Schätzungen zufolge leiden alleine in der Bundesrepublik Deutschland ca. 3-5 Millionen Menschen unter chronischen Wunden. Die Inzidenz dieser Erkrankung steigt stetig an, was vor allem auf die zunehmende Alterung der Bevölkerung zurück zu führen ist. Die Wahrscheinlichkeit an einer chronischen Wunde zu erkranken beträgt in den westlichen Industrienationen ca. 1-2%; jenseits des 80. Lebensjahres steigt die Inzidenz sogar auf 4-5%. Die Gesamtkosten für Therapien betragen über 3 Milliarden Euro jährlich und belasten somit das Gesundheitswesen deutlich.

Die Reepithelialisierung der Wunde durch Keratinozyten stellt durch die Wiederherstellung der Haut-Barrierefunktion und die damit einhergehende Abwehr potentieller Pathogene sowie den Rückhalt körpereigener Flüssigkeiten einen essentiellen Teil der Wundheilung dar. Seit mehr als 40 Jahren werden in der Literatur kontroverse Mechanismen diskutiert, welche die Reepithelialisierung und die damit einhergehende Bildung einer epidermalen Migrationszunge postulieren. Die diskutierten Mechanismen lassen hierbei die kollektive Zellmigration als möglichen Einflussfaktor sowie insbesondere die unverwundeten Regionen während der Reepithelialisierung vollkommen außer Acht. Nur durch eine systembiologische Betrachtungsweise können hier fundamental neue Einsichten gewonnen werden.

Im Rahmen des MedSys-Konsortiums ‚*Chronic Wounds - Medical Systems Biology of Chronic Wounds*‘ wurde im Rahmen des Arbeitsprogramms 4A (*Workpackage 4A, WP4A*) ein organotypisches Wundheilungsmodell etabliert welches reproduzierbare, *in vivo* ähnliche Wundheilungsszenarien ermöglichte. Auf Basis dieses Modells erfolgte die Analyse der Reepithelialisierung aus einer systembiologischen Perspektive und führten zu einem neuen Reepithelialisierungsmechanismus, der Proliferation sowie kollektive Zellmigration als essentielle Faktoren in sich vereint. Der beschriebene Reepithelialisierungsmechanismus konnte im Rahmen des WP1B in einem Multi-Agenten Model *in silico* reproduziert und durch experimentelle Perturbation mittels synthetischen Peptiden verifiziert werden. Folgende

Komponenten sind nach Abschluss des Projektes etabliert und können in weiteren Forschungsprojekten genutzt werden.

- Organotypisches *in vitro* Wundheilungsmodell
- Analysepipeline bestehend aus: (i) automatisierter immunhistologischer Färbung, (ii) Digitalisierung der feingeweblichen Schnittpräparate mittels der Mikroskopieplattform Nanozoomer, (iii) Bildverarbeitung mittels Aperio und Visiopharm Software
- Modellierungs- und Simulationsplattform EPISIM und die damit realisierten *in silico* Modelle der epidermalen Homöostase und der Reepithelialisierung akuter epidermaler Wunden