

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie**

der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

Untersuchung von im Tissue-Engineering-Verfahren

hergestellten Oral-Mukosa-Äquivalenten

mittels RT-qPCR

(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction)

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael Mildenberger

aus Fellbach

Würzburg, Dezember 2016

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Tobias Reuther

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. hum. biol. Heike Walles

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2017

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Tissue Engineering.....	1
1.1.1	Geschichtliche Entwicklung des Tissue Engineering	1
1.1.2	Prinzip des Tissue Engineering	1
1.1.3	Anwendungsgebiete des Tissue Engineering der oralen Mukosa ..	4
1.2	Die orale Mukosa	6
1.2.1	Funktion und Aufbau der oralen Mukosa	6
1.2.2	Ultrastruktur und Genexpressionsmarker der oralen Mukosa.....	11
1.3	Polymerase-Kettenreaktion	14
1.3.1	Geschichte.....	14
1.3.2	Grundlagen.....	15
1.3.3	Detektionsmethoden bei der Real-Time PCR.....	16
1.3.4	Schmelzkurvenanalyse.....	20
1.3.5	Absolute und relative Quantifizierung	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	23
2.	Material und Methoden.....	24
2.1	Reagenzien	24
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Laborkits und Zellkulturmedien	24
2.1.2	Primer für die Real-time PCR mit dem Lightcycler 1.5 von Roche	26
2.1.3	Zellträger (Scaffolds)	27
2.2	Geräte	27
2.3	Verwendete Software	28
2.4	Patienten und Untersuchungsmaterial	28
2.5	Gewinnung von humanen Fibroblasten und Keratinozyten	29
2.6	Besiedelung der Scaffolds.....	30
2.6.1	Kultivierung von Fibroblasten (Dermal-Äquivalente).....	30
2.6.2	Kultivierung von Fibroblasten und Keratinozyten (Oral-Mukosa- Äquivalente).....	30
2.6.3	Kultivierung von Keratinozyten (Epidermal-Äquivalente).....	31
2.7	Isolierung der RNA.....	32
2.8	Konzentrationsbestimmung der RNA	32
2.9	Herstellung von cDNA aus RNA.....	33
2.10	Auswahl der PCR-Primer	34
2.11	Auswahl des Referenzgens	34

2.12	Standardkurven und Bestimmung der Effizienz	34
2.13	Gelelektrophorese.....	36
2.14	Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)	37
2.14.1	Beladungsschema.....	39
2.14.2	Kalibrator	40
2.14.3	DMSO.....	40
2.14.4	Schmelzkurvenanalyse.....	40
2.15	Berechnung der Verhältnisse (Ratios)	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Konzentration der RNA	42
3.2	Einstellen der Primerbedingungen	43
3.3	Auswahl des Referenzgens.....	44
3.4	Genexpressionsanalyse mittels Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction).....	46
3.4.1	Deskriptive Statistik	47
3.4.2	Induktive Statistik.....	52
4.	Diskussion.....	56
4.1	Auswahl des Referenzgens.....	57
4.2	Einstellen der Primerbedingungen	58
4.3	Genexpressionsanalyse mittels Real-time PCR.....	58
5.	Zusammenfassung.....	62
6.	Literaturverzeichnis	64
7.	Anhang.....	69
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	69
7.2	Tabellenverzeichnis.....	70
7.3	Abkürzungsverzeichnis	71

1. Einleitung

1.1 Tissue Engineering

1.1.1 Geschichtliche Entwicklung des Tissue Engineering

Die Geschichte der Hauttransplantationen beginnt vor etwa 3000 Jahren, als in Indien mit Haut und Unterhautfett aus der Gesäßregion Nasen rekonstruiert wurden, die aufgrund von richterlichen Bestrafungen amputiert wurden (Hauben, Baruchin et al. 1982). Die mit der Versorgung von Haut- und Schleimhautdefekten durch autologe Transplantate einhergehenden Probleme und Schwierigkeiten wie Morbiditäten der Entnahmestelle, persistente Eigenschaften des Spendergewebes, sowie allgemein ein begrenztes Angebot an Spendergewebe ließen Wissenschaftler zu Beginn der 1980er-Jahre vermehrt in die Entwicklung eines diese Probleme umgehenden Gewebeersatzes investieren (Moharamzadeh, Brook et al. 2007). Die ersten kultivierten Gewebe beschränkten sich auf die Versorgung von Verbrennungen mit Epithelschichten (Madden, Finkelstein et al. 1986). Einen großen Fortschritt brachte die dreidimensionale *in-vitro*-Kultivierung von Keratinozyten allein oder in Kombination mit Fibroblasten auf speziellen Gerüsten, welche in Patienten transplantiert wurden und mit denen erste zufriedenstellende klinische Ergebnisse erzielt wurden (Lauer and Schimming 2001; Izumi, Feinberg et al. 2003).

1.1.2 Prinzip des Tissue Engineering

Aus den Anfängen der Gewebezüchtung entwickelte sich ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, das Tissue Engineering, welches die bioartifizielle Herstellung von Körpergeweben darstellt und ein Zusammenwirken von Biologie, Medizin, Biochemie und Materialwissenschaften erfordert.

Die Definition des Tissue Engineering erfolgte auf der Konferenz der National Science Foundation im Jahr 1988 und lautet folgendermaßen (Kasper 2005):

„... the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationship in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, remain or improve tissue function.“

„... die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften mit dem Ziel des grundlegenden Verständnisses der Beziehung zwischen Struktur und Funktion in normalen und erkrankten Säugergeweben und die Entwicklung von biologischem Ersatz zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion.“

Das Prinzip des Tissue Engineering ist es, Körperzellen einem Patienten zu entnehmen und im Labor zu vermehren, damit diese später wieder reimplantiert werden können. Dabei werden nach Möglichkeit autologe Zellen verwendet, da so eine Abstoßungsreaktion bei der Reimplantation vermieden werden kann. Für die Zellvermehrung sind häufig Trägermaterialien, sogenannte Matrizes oder Scaffolds nötig, die entweder natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Bei der Verwendung von Trägermaterialien tierischen Ursprungs muss eine Gefährdung durch Übertragung von Krankheitserregern, insbesondere Viren, diskutiert werden (Kasper 2005).

Das Tissue Engineering beruht auf drei Säulen, der sogenannten „tissue engineering triad“, die sich von den drei Hauptkomponenten des Gewebes ableiten: Zellen, Trägermaterial (extrazelluläre Matrix) und Wachstumsfaktoren (Alsberg, Hill et al. 2001) (Abbildung 1). Ein funktionierendes Gewebe kann mit Hilfe dieser Komponenten entwickelt werden. Dabei spielt das Verständnis der Wechselwirkung zwischen extrazellulärer Matrix und Zellen, sowie der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Proliferation und gewebespezifische Differenzierung im Hinblick auf ein erfolgreiches Gewebedesign eine wichtige Rolle. Nur so kann das Wissen aus der Grundlagenforschung in eine zielführende Entwicklung der Komponenten münden (Scheller, Krebsbach et al. 2009).

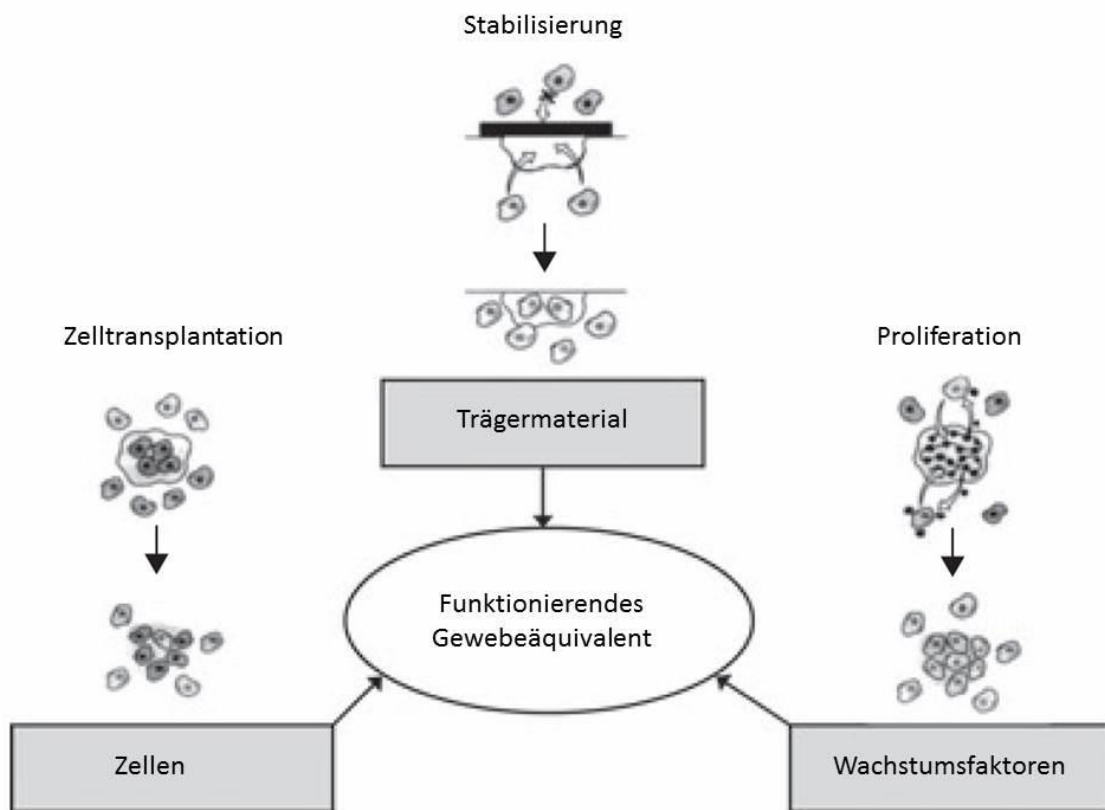


Abbildung 1: Drei Säulen des Tissue Engineering "tissue engineering triad", verändert nach Scheller et al. (Scheller, Krebsbach et al. 2009)

Insbesondere bei der Auswahl des Trägermaterials (Scaffold), das initial als Ersatz für die extrazelluläre Matrix und damit der Stabilisierung der Zellen dient, sind Biokompatibilität, mechanische Eigenschaften und Resorptionsfähigkeit von großer Bedeutung (Moharamzadeh, Brook et al. 2007). Es kommen Materialien unterschiedlichen Ursprungs zum Einsatz, darunter natürliche Scaffolds wie zellfreie Dermis (Izumi, Takacs et al. 1999; Cho, Ahn et al. 2000), auf Kollagen basierte (Masuda 1996; Moriyama, Asahina et al. 2001), wie Kollagen-Glykosaminoglykan (Ojeh, Frame et al. 2001) und Kollagen-Glykosaminoglykan-Chitosan (Black, Bouez et al. 2005), fibrinbasierte (Kaiser, Stark et al. 1994; Ruszymah 2004) oder auf Gelatine basierte Gerüste (Lee, Jeon et al. 2003; Mao, Liu et al. 2003). Des Weiteren werden synthetische Gewebe wie Polymere (Kim, Suh et al. 2004; Ng, Khor et al. 2004) und Gerüste die sowohl aus natürlichen als auch aus synthetischen Materialien bestehen,

sogenannte Hybridgerüste (Ng, Tham et al. 2005; Wang, Pieper et al. 2005), verwendet.

1.1.3 Anwendungsgebiete des Tissue Engineering der oralen Mukosa

Bei der Auswahl der Zellen und Trägermaterialien ist das Anwendungsgebiet von großer Bedeutung. Es lassen sich zwei Hauptgebiete unterscheiden: zum einen die klinische Anwendung, wie Transplantationen zum Ersatz von Gewebedefekten z.B. nach Tumorresektion oder die gesteuerte Geweberegeneration, zum anderen die Verwendung als *in vitro* Testmodelle zur Erprobung von Materialien auf ihre Biokompatibilität und als Modelle für die Erforschung oraler Krankheiten. Dadurch kann immer häufiger auf Tierversuche verzichtet werden (Moharamzadeh, Colley et al. 2012).

Während bei der klinischen Anwendung die Hauptanforderung an das gezüchtete Gewebe vor allem in einem biokompatiblen Trägermaterial mit möglichst guter mechanischer Stabilität liegt, das zwar der natürlichen Beanspruchung Stand hält, aber so gut resorbierbar ist, dass es zu keiner Fremdkörperabstoßung kommt, liegt die Anforderung bei *in vitro* Testmodellen in einer sehr hohen reproduzierbaren Biostabilität, die auch durch viral veränderte oder aus Tumorgewebe stammende Zellen erreicht werden kann, was bei der klinischen Anwendung ausgeschlossen ist (Moharamzadeh, Brook et al. 2007).

Bei der klinischen Anwendung wird die Verwendung als möglicher Ersatz bei Gaumenspalten (Luitaud, Laflamme et al. 2007) und die Verwendung in der plastischen Parodontalchirurgie an Zähnen (Mohammadi, Shokrgozar et al. 2007) und Implantaten (Mohammadi, Mofid et al. 2011) mit inadäquaten Weichgewebsverhältnissen beschrieben. Bei der extraoralen Anwendung kann gezüchtete orale Mukosa unter anderem bei der Rekonstruktion von Harnleitern zum Einsatz kommen (Bhargava, Patterson et al. 2008).

Beim Einsatz als *in vitro* Testmodell wird unter anderem die Verwendung in der Erforschung des oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben (Marsh, Suchak et al. 2011). Auch in der Erforschung der Pathogenese von *Candida albicans*

(Mostefaoui, Claveau et al. 2004), sowie bei der Untersuchung des Penetrationsverhaltens von Porphyromonas gingivalis (Andrian, Grenier et al. 2004) und Fusobacterium nucleatum (Gursoy, Pollanen et al. 2010) bei Parodontitis spielt bioartifizuell hergestellte orale Mukosa eine wichtige Rolle. Bei der Untersuchung der Biokompatibilität von zahnmedizinischen Materialien werden diese *in vitro* Modelle z.B. bei Dentinhaftvermittlern (Vande Vannet and Hanssens 2007) und Mundspülungen (Moharamzadeh, Franklin et al. 2009) zur Überprüfung von Effekten auf die Mundschleimhaut verwendet.

1.2 Die orale Mukosa

1.2.1 Funktion und Aufbau der oralen Mukosa

Die orale Mukosa kleidet die gesamte Mundhöhle aus und dient zum Schutz der darunter liegenden Gewebe vor mechanischen und chemischen Einflüssen, sowie als Barriere vor bakteriellen Infektionen (Presland and Jurevic 2002). Die immunologischen Schutzmechanismen beruhen dabei im Bereich der zellulären Abwehr vor allem auf Lymphozyten und Makrophagen in der Lamina propria sowie Langerhans-Zellen im Plattenepithel und im Bereich der humoralen Abwehr auf der Ausschüttung des sekretorischen Immunglobulin A. Die feuchte Oberfläche der Mundschleimhaut bietet dabei nicht nur einen mechanischen Schutz beim Kauen und Schlucken, sondern hat auch Bedeutung bei der Sprachgestaltung.

Die Mundschleimhaut hat auch die Funktion der Sinneswahrnehmung und besitzt dazu Mechanorezeptoren, Thermorezeptoren und Nozizeptoren wie Merkel-Zellen und freie Nervenendigungen, die auf Druck und Temperatur reagieren und der Schmerzempfindung dienen (Barth, Richter et al. 1991; Lüllmann-Rauch 2012). Die Sekretion von Speichel ist vor allem bei der Nahrungsverarbeitung in Form von Andauung durch α -Amylase und bei der Mineralisation und Reinigung der Zähne von Bedeutung (Barth, Richter et al. 1991).

Grundsätzlich besteht die Mundschleimhaut überall aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, das je nach Region unverhornt oder verhornt vorliegen kann, und einem darunter liegenden Bindegewebe, der Lamina propria. Diese beiden Hauptgewebsschichten sind durch die Basalmembran getrennt. Sie besteht aus verschiedenen Matrixbestandteilen und kann durch Färbung im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden (Garant 2003; Lüllmann-Rauch 2012). Der Übergang zwischen Epithel und Lamina propria ist häufig unregelmäßig, da das Bindegewebe mit dem darüber liegenden Epithel über Bindegewebspapillen regelrecht verzahnt ist (Nanci 2007). Teilweise liegt unterhalb der Lamina

propria noch eine weitere bindegewebige Schicht, die Submukosa. Diese enthält kleine Speicheldrüsen, Fettgewebe, die Hauptblutgefäße, Nervenendigungen und lymphatisches Gewebe (Garant 2003). Liegt diese nicht vor, wie beispielsweise im Bereich der Gingiva oder des harten Gaumens, und die Schleimhaut ist direkt mit dem darunterliegenden Knochen über das Periost verbunden, so spricht man von Mukoperiost (Nanci 2007).

Es lassen sich auf Grund der Lage, Funktion und Aufbau drei verschiedene Mundschleimhauttypen unterscheiden (Garant 2003; Nanci 2007)(Abbildung 2):

Die **mastikatorische Mundschleimhaut**, die sich im Bereich des Zahnfleisches und des Gaumens befindet und damit die stark mechanisch belasteten Bereiche bei der Kaufunktion schützt. Das Epithel ist verhornt (para- oder orthokeratinisiert) und das Bindegewebe besitzt lange, dicht angeordnete Bindegewebspapillen, welche das Gewebe ohne dazwischenliegende Submukosa mit dem Knochen verbinden.

Die **auskleidende Schleimhaut**, welche sich in mechanisch wenig beanspruchten Bereichen befindet. Sie ist sehr elastisch und durch das Bindegewebe verschieblich mit den darunter liegenden Strukturen verbunden. Das Epithel ist unverhornt und das Bindegewebe ist sehr gut durchblutet und besitzt elastische Fasern. Die Submukosa enthält häufig Drüsen. Weicher Gaumen, Lippen, Alveolarkamm, Wangen, Mundboden und Vestibulum sind mit auskleidender Mundschleimhaut bedeckt.

Die **spezialisierte Mundschleimhaut**, die sich auf dem Zungenrücken befindet, ist unverschieblich mit der Zungenmuskulatur verbunden. Sie liegt sowohl verhornt als auch unverhornt vor und besitzt Zungenpapillen und Geschmacksknospen.

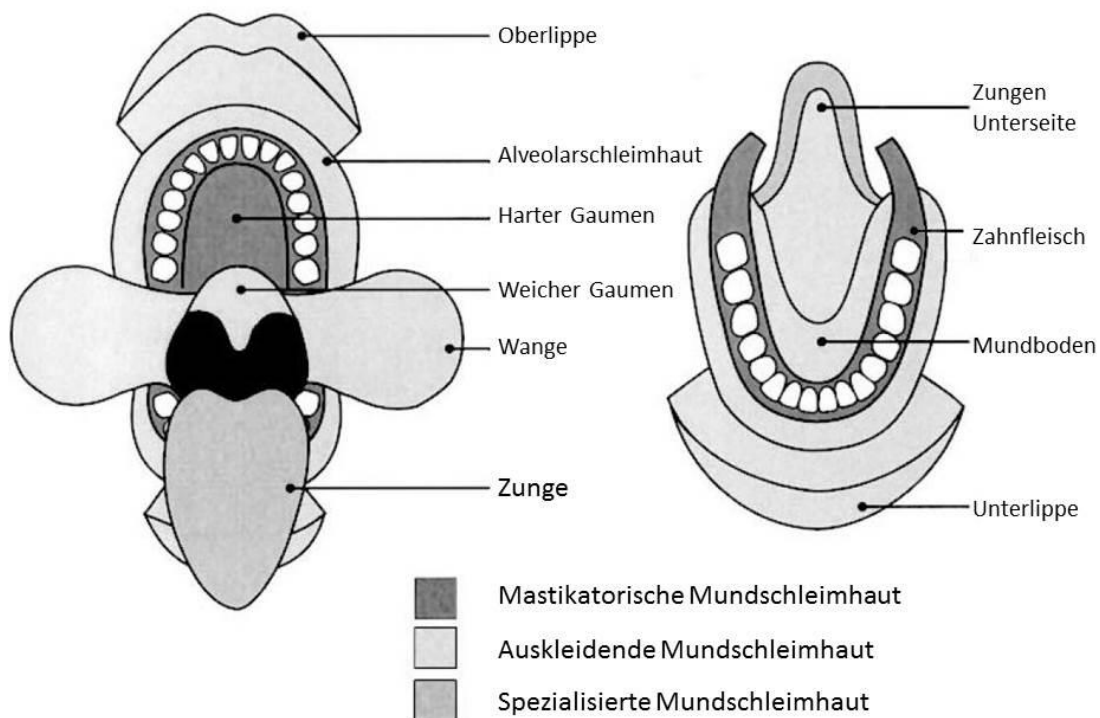


Abbildung 2: Mundscheidhauttypen nach Lage und Funktion, verändert nach Squier et al. (Squier and Kremer 2001)

Das mehrschichtige Plattenepithel der Mundscheidhaut lässt sich grundsätzlich in vier funktionell und strukturell unterschiedliche Hauptschichten unterteilen, wobei sich der Schichtenaufbau von verhorntem und unverhorntem Epithel unterscheidet (Abbildung 3). Die Gemeinsamkeiten dieser beiden Zellreifungswege liegen in einer Basalzellschicht (Stratum basale), welche als Reservoir für Stamm- und Vorläuferzellen (Progenitorzellen) dient und einem Stratum spinosum, welches der Basalzellschicht aufliegt. Während des Reifungsprozesses durchlaufen die Progenitorzellen passiv die verschiedenen Schichten und Reifungsprozesse bis zur Oberfläche wo sie abgestoßen und durch nachkommende Zellen ersetzt werden (Nanci 2007).

Dem Stratum spinosum folgt im verhornten Plattenepithel das Stratum granulosum mit mikroskopisch sichtbarer Granulierung des Zytoplasmas durch Keratohyalin granula und schließlich das Stratum corneum mit kernlosen, sehr flachen und nicht mehr vitalen Hornzellen.

Im unverhornten Plattenepithel folgt den beiden basalen Zellschichten das Stratum intermedium, in welchem der Zellkern pyknotisch wird und sich dann im Stratum superficiale immer weiter verdichtet (Lüllmann-Rauch 2012).

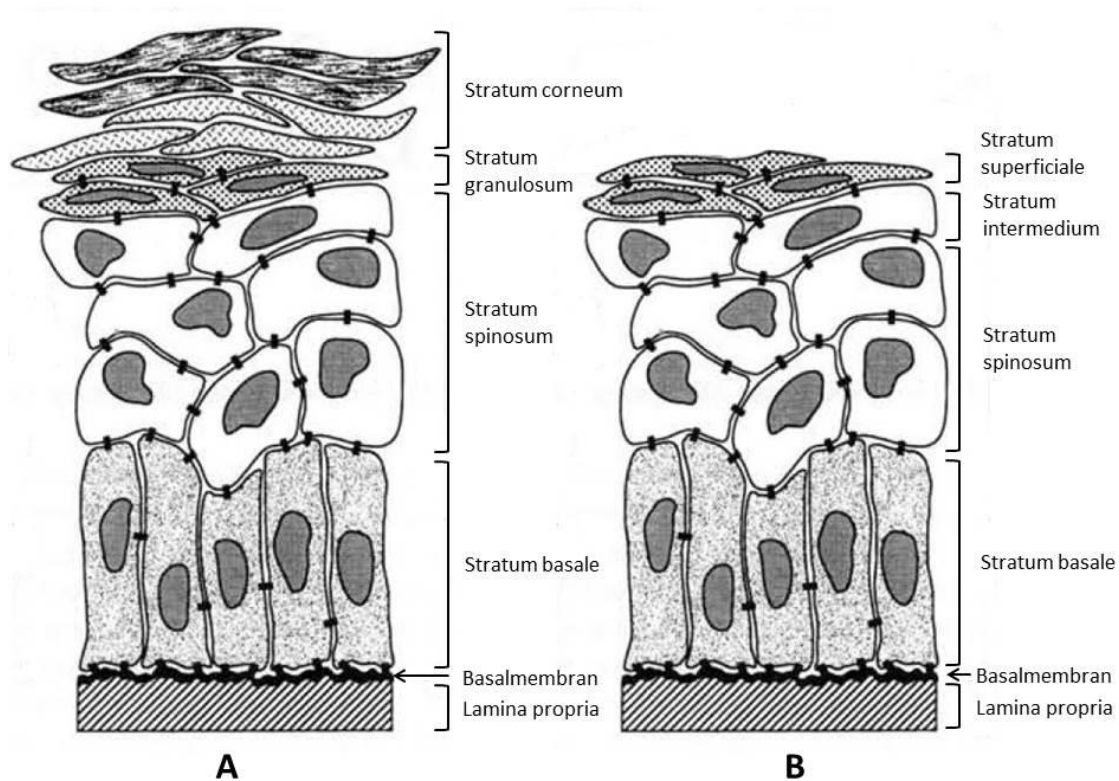


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der verhornten (A) und unverhornten (B) Mundschleimhaut, verändert nach Presland et al. (Presland and Dale 2000)

Charakteristika der Schichten des Plattenepithels:

Stratum basale: Das Stratum basale besteht aus einer Schicht zylindrischer Zellen, die über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden sind. Diese Zellen besitzen Tonofibrillen und andere Zellorganellen. Es liegt eine hohe Zellteilungsaktivität vor. Dabei sorgen die Stammzellen, ein kleinerer Anteil von Progenitorzellen, für die Aufrechterhaltung des Proliferationspotenzials und ein größerer Anteil von transient amplifizierenden Zellen für die Bereitstellung von Zellen für die weitere Differenzierung (Garant 2003; Nanci 2007). Nur die Zellen des Stratum basale haben die Fähigkeit, DNA zu synthetisieren und sich zu teilen (Fuchs 1990).

Stratum spinosum: Die Zellen des Stratum spinosum besitzen eine polygonale Zellform und sind in mehreren Schichten angeordnet (Lüllmann-Rauch 2012). In dieser Schicht beginnen die Zellen sich zu differenzieren und bilden vermehrt Zellkontakte in Form von Desmosomen, Adherens junctions und Gap junctions aus (Garant 2003).

Stratum granulosum: Im Stratum granulosum beginnt der Verhornungsprozess. Dabei verbinden sich Zytokeratinfilamente, vor allem Filaggrin, zu Keratohyalin granula, die auch für die Namensgebung dieser Schicht verantwortlich sind (Garant 2003).

Stratum corneum: Im Stratum corneum kommt es durch Quervernetzung der Zytokeratinfilamente zur Bildung von Keratin und damit zu einer vollständigen Verhornung. Verschwindet der Zellkern vollständig, wird das Epithel als orthokeratinisiert bezeichnet, wenn noch pyknotische Zellkerne vorhanden sind, als parakeratinisiert (Lüllmann-Rauch 2012). Die verhornten Zellen sind von einer „cornified envelope“ umgeben, einer Umhüllung aus quervernetzten Proteinen und Lipiden, welche die Plasmamembran ersetzt und einen wichtigen Teil der epithelialen Barriere darstellt (Presland and Dale 2000).

Stratum intermedium: Das Stratum intermedium besteht aus leicht abgeflachten Zellen, in denen es zur Pyknose des Zellkerns kommt. Die Zellen besitzen einen hohen Glykogengehalt und viele verstreute Tonofilamente (Nanci 2007).

Stratum superficiale: Die Zellen des Stratum superficiale besitzen einen pyknotischen Zellkern und es sind auch weniger Zellorganellen vorhanden. Der Glykogengehalt ist wie im Stratum intermedium sehr hoch (Nanci 2007).

1.2.2 Ultrastruktur und Genexpressionsmarker der oralen Mukosa

Während des Zellreifungsprozesses in verhornten und unverhornten mehrschichtigen Plattenepithelien, wie der oralen Mukosa, kommt es zur Ausschüttung von Proteinen, die für die weitere Reifung und Differenzierung essentiell und für das jeweilige Differenzierungsstadium typisch sind (Fuchs and Green 1980).

Lamina propria

Die Hauptzelltypen der Lamina propria, welche die unterstützende Bindegewebsschicht des Epithels darstellt, sind vor allem Fibroblasten, aber auch Mastzellen, Makrophagen und andere Abwehrzellen wie Lymphozyten und Plasmazellen. Diese sind von einer formlosen Grundsubstanz umgeben, die von Blutgefäßen und Nervenfasern durchsetzt ist und von einer interzellulären Matrix aus Kollagenfasern, Elastin, Fibronektin und elastischen Fasern stabilisiert wird. Die Kollagenfasern bestehen vor allem aus Kollagen I und III, wobei aber auch die Kollagene IV und VII als Teil der Basalmembran zu finden sind. Die Grundsubstanz enthält heterogene Molekularkomplexe aus Proteoglykanen, wie Hyaluronan, Heparansulfat, Versikan, Syndekan und Glykoproteinen, die von Gewebsflüssigkeit umgeben und durchsetzt sind. Die Grundsubstanz und das Fasernetz werden von den Fibroblasten synthetisiert (Nanci 2007).

Basalmembran

Über die Basalmembran ist das Epithel mit dem darunterliegenden Bindegewebe verbunden. Die Basalmembran besteht aus zwei Komponenten: der Basallamina, welche sich noch in die Lamina lucida und die Lamina densa unterteilt und für die Verankerung der Epithelzellen sorgt, und der Lamina fibroreticularis, welche sich am Bindegewebe verankert (Lüllmann-Rauch 2012). Die Verankerung der Epithelzellen geschieht über Hemidesmosomen, die sich aus drei Proteinkomponenten zusammensetzen, den intrazellulären Adaptorproteinen, den Transmembranproteinen und den basallamina-

assozierten Proteinen (Abbildung 4). Die Intermediärfilamente u.a. Keratin K5 und K14 des Zytoskeletts der Keratinozyten des Stratum basale werden mit der Plasmamembran über die Adaptorproteine BP230 und Plectin verbunden. Diese haften wiederum an den Transmembranproteinen BP180 und Integrin $\alpha 6 \beta 4$, welche auch essentiell an der Signalkaskade beteiligt sind, die die Proliferation und Differenzierung der Zellen steuert. Die Transmembranproteine werden über das kreuzförmige Ankerfilament Laminin 5 mit der Basallamina verbunden. Diese besteht aus verschiedenen Lamininen und Kollagen IV, welche als Trägernetze vorliegen und über die Glykoproteine Nidogen und Perlecan miteinander verbunden sind (Borradori and Sonnenberg 1999). Die Lamina fibroreticularis besteht neben Kollagen III auch noch aus den Kollagenen VI, XV und XVIII, sowie Proteoglykanen, Fibulinen und Fibronectinen. Sie ist über Ankerfibrillen aus Kollagen VII mit der Basallamina verbunden (Lüllmann-Rauch 2012).

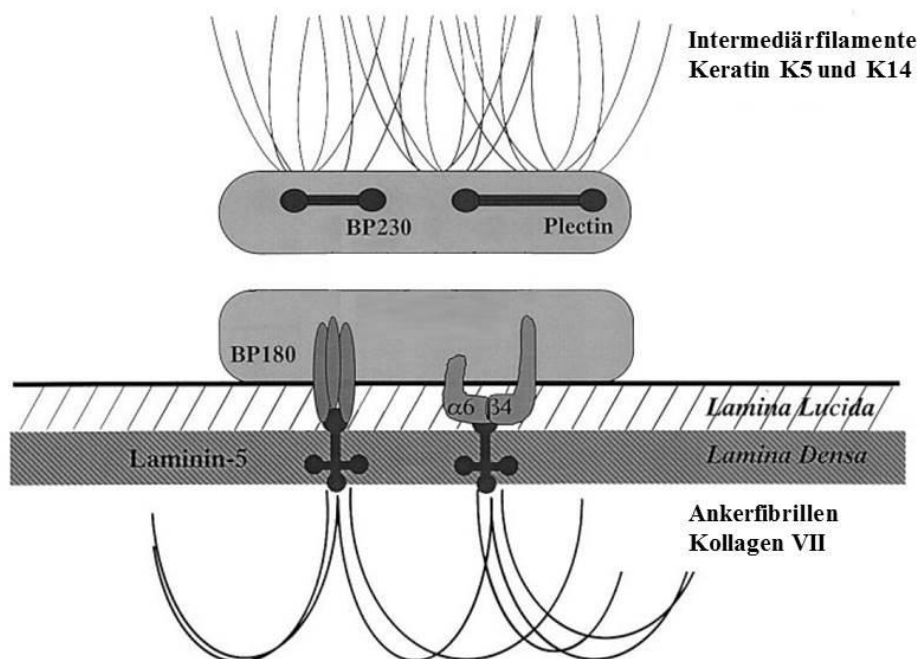


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Hemidesmosoms, verändert nach Borradori et al. (Borradori and Sonnenberg 1999)

Epithel

Das Epithel besteht vor allem aus Keratinozyten, die wie beschrieben in vier Hauptschichten unterteilt sind (Eckert, Crish et al. 1997). Es finden sich aber auch Merkelzellen, Langerhanszellen und Melanozyten (Garant 2003; Nanci 2007). Im Stratum basale besitzen die Zellen ein Zytoskelett, das vor allem aus Keratin K5 und K14 aufgebaut ist (Fuchs 1990; Presland and Dale 2000). In unverhorntem Plattenepithel ist zusätzlich Keratin K19 zu finden (Presland and Dale 2000). Die Keratinausschüttung verändert sich im Verlauf der Differenzierung, wobei zwischen verhorntem und unverhorntem Plattenepithel unterschieden werden muss. In verhorntem Plattenepithel werden vor allem die Keratine K1 und K10 ausgeschüttet, wogegen in unverhorntem Plattenepithel die Keratine K4 und K13 vorherrschend sind (Presland and Dale 2000; Garant 2003). Die frühen Differenzierungsmarker Involucrin und das Enzym Transglutaminase sind im Stratum spinosum noch in beiden Zellreifungswegen zu finden, ebenso wie Loricrin in der weiteren Differenzierung, während Filaggrin ausschließlich in verhorntem Plattenepithel ausgeschüttet wird (Eckert, Crish et al. 1997; Garant 2003). Während die Zelladhäsion zur Basalmembran wie beschrieben vor allem durch Hemidesmosomen geschieht, wird der Kontakt zwischen den Zellen insbesondere im Stratum spinosum über Desmosomen hergestellt. Dabei binden die Transmembranmoleküle Desmoglein und Desmocollin, die zur Familie der Cadherine gehören, innerhalb des 30 nm breiten Zellspaltes zwischen den Plasmamembranen aneinander. Verankert werden diese Glykoproteine über sogenannte Plaquemoleküle, zu denen unter anderem Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin gehören, die wiederum an den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts verankert sind. Ebenso wie die Hemidesmosomen sind die Desmosomen an der Signalkaskade für die Strukturveränderung und möglicherweise auch an der Differenzierung der Keratinozyten beteiligt (Green and Jones 1996).

1.3 Polymerase-Kettenreaktion

1.3.1 Geschichte

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction oder PCR) stellt auch heute noch eines der bedeutendsten Instrumente der Molekularbiologie dar. 1971 wurde zum ersten Mal eine Methode zur biochemischen Amplifikation von DNA *in vitro* beschrieben (Kleppe, Ohtsuka et al. 1971). Erfunden und weiterentwickelt wurde die PCR 1983 von Karry Mullis, der dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt (Mullis 1994). Er hatte auch 1986 die Idee eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* zu isolieren und für die Amplifikation zu verwenden, damit nicht vor jedem Amplifikationszyklus neue Polymerasen hinzugegeben werden mussten, da diese durch den Denaturierungsvorgang während eines Amplifikationszyklus der DNA ebenfalls zerstört wurden (Mullis, Faloona et al. 1986; Mullis and Faloona 1987). Erstmals veröffentlicht wurde die Beschreibung der Methode der PCR und ihrer klinischen Anwendungsmöglichkeiten 1985 (Saiki, Scharf et al. 1985). Die PCR-Methoden wurden stetig weiterentwickelt um die Handhabung, Schnelligkeit und Spezifität zu verbessern. 1991 gelang erstmals mittels der Exonuklease-Aktivität der *Thermus-aquaticus*-Polymerase eine Detektion der PCR-Produkte während des Amplifikationsprozesses und somit der erste Schritt in Richtung Real-Time PCR (Holland, Abramson et al. 1991). Diese Idee wurde weiterentwickelt, indem der Anstieg des Fluoreszenzsignals von Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert, in Echtzeit detektiert wurde (Higuchi, Dollinger et al. 1992; Higuchi, Fockler et al. 1993). Heute werden in der Real-Time PCR wesentlich sensitivere Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green I oder sequenzspezifische Sonden zur Detektion der PCR-Produkte verwendet (Alvarez and Done 2014).

1.3.2 Grundlagen

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur Vervielfältigung von definierten DNA-Sequenzen, mit der innerhalb kurzer Zeit geringste, kaum messbare DNA-Mengen so oft vervielfältigt werden können, dass sie mit den gängigen Labormethoden weiter untersucht werden können. Sie beruht auf der Abfolge von drei wiederkehrenden Schritten, welche auch als PCR-Zyklus bezeichnet werden. Dabei binden Oligonukleotid-Primer an der Zielsequenz der komplementären DNA-Stränge und vervielfältigen diese mittels einer DNA-Polymerase. Anschließend werden die neu entstandenen Doppelstränge wieder zu Einzelsträngen aufgeschmolzen und der Zyklus beginnt erneut (Erich 1989).

Die PCR-Schritte im Einzelnen (Mullis, Faloona et al. 1986; Erlich 1989):

1. Denaturierung: Durch Erhitzen des Reaktionsgemischs auf über 90°C denaturiert die DNA, d.h. der DNA-Doppelstrang teilt sich in zwei Einzelstränge, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren aufbrechen, während die kovalenten Bindungen innerhalb des Strangs zwischen Desoxyribose und Phosphaten intakt bleiben.

2. Annealing: Nach Absenkung der Temperatur auf 55°C bis 60°C kommt es zur Anlagerung der Primer-Paare, welche jeweils mit ihrem 5'-Ende, d.h. der freien Phosphatgruppe am 5'-Kohlenstoffatom des Zuckers der Oligonukleotide, die Zielsequenz begrenzen. Die Anlagerung der Primer geschieht durch den hohen Überschuss an Primern im Reaktionsgemisch unmittelbar nach Auftrennung des Doppelstrangs und mit hoher Spezifität nur an den exakt komplementären Abschnitten zu ihrer Sequenz.

3. Elongation: Nach Anlagerung der Primer beginnt die Polymerase von der OH-Gruppe des 3'-Endes, also des 3'-Kohlenstoffatoms des Zuckers, weitere Nukleotide zu synthetisieren, die genau den komplementären Basen der

Zielsequenz entsprechen. Dies geschieht bei Temperaturen um 72°C. Die Dauer der Inkubationszeit ist abhängig von der Länge der Zielsequenz.

Idealerweise entstehen so nach jedem PCR-Zyklus aus einem Doppelstrang zwei Doppelstränge und aus einem einzigen DNA-Molekül mit Zielsequenz zu Beginn der Reaktion bei einer angenommenen Effizienz von 100 % nach 20 Zyklen über eine Million Kopien (2^{20}). Damit eine Amplifikation stattfinden kann, müssen außer der DNA-Probe, den Primern und der DNA-Polymerase dem Reaktionsgemisch noch Desoxyribonukleosid-Triphosphate und Puffer hinzugefügt werden (Erlich 1989).

1.3.3 Detektionsmethoden bei der Real-Time PCR

Die Real-Time PCR stellt im Vergleich zur konventionellen PCR eine sehr genaue und schnelle Methode zur Quantifizierung von DNA-Sequenzen dar. Ihr Vorteil liegt darin, dass die Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle in Echtzeit während der PCR gemessen wird und keine fehleranfällige Nachbehandlung zur Detektion der amplifizierten DNA nötig ist, so werden Kreuzkontaminationen durch PCR-Produkte verhindert (Heid, Stevens et al. 1996). Die Detektion der amplifizierten DNA geschieht in Echtzeit über verschiedene Fluoreszenzsignale, dabei erfolgt der Anstieg des Fluoreszenzsignals typischerweise in drei verschiedenen Phasen (Wilhelm and Pingoud 2003)(Abbildung 5):

1. Hintergrundphase (lag-Phase): Die Menge an PCR-Produkten reicht nicht aus, um einen Fluoreszenzanstieg zu messen.

2. Exponentielle Phase (log-lineare Phase): Es findet ein Anstieg des Fluoreszenzsignals statt. Wird es in logarithmischem Maßstab dargestellt, findet ein linearer Anstieg über eine gewisse Anzahl an Zyklen statt. Der Wert, bei dem das Fluoreszenzsignal der PCR-Wachstumskurve erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, nennt sich C_t -Wert oder Crossing-Point. Er

gibt die Zyklenzahl an, bei der die PCR-Wachstumskurve in ihrer exponentiellen Phase den Fluoreszenzschwellenwert überschreitet.

3. Plateau-Phase: Die Reaktion ist beendet und es findet kein weiterer Anstieg des Fluoreszenzsignals statt. Die Plateau-Phase lässt sich unter anderem durch den Verbrauch an Reaktionskomponenten (Desoxyribonukleosid-Triphosphate und Primer), die Inaktivierung der Polymerase, Inhibition der Enzymaktivität durch erhöhte Pyrophosphat-Konzentration, sowie die Reassoziaton der Amplifikate erklären (Kainz 2000).

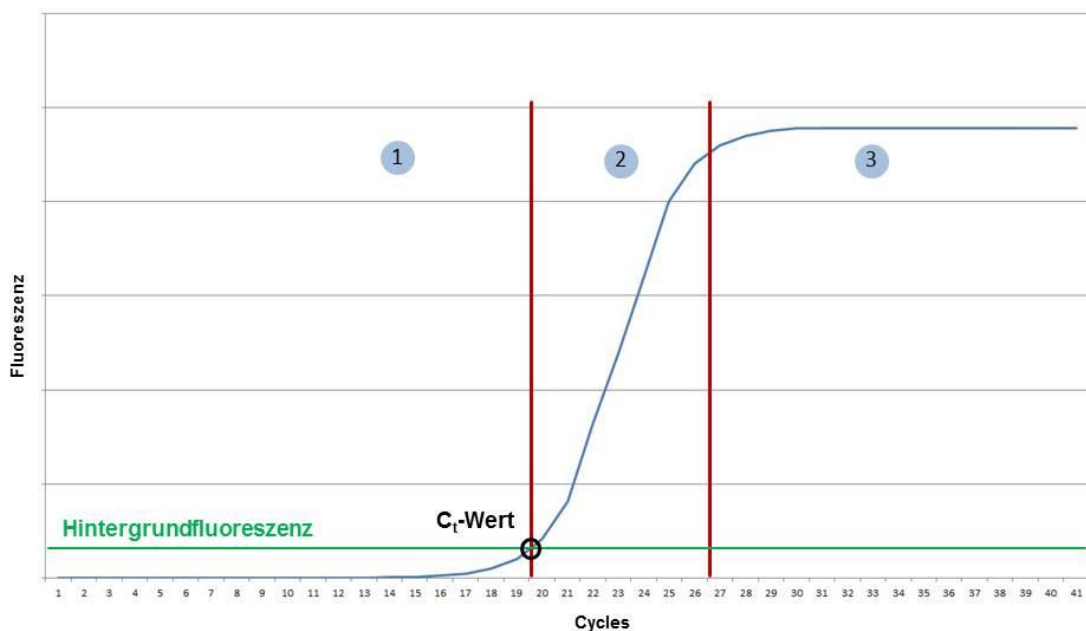


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzsignals bei einer PCR mit lag-Phase (1), log-lineare Phase (2) und Plateau-Phase (3), der Schnittpunkt der Fluoreszenzkurve mit der Hintergrundfluoreszenz ist der C_t-Wert

Das Fluoreszenzsignal, das den Anstieg der PCR-Produkte darstellt, kann entweder über Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt werden, die sich in doppelsträngige DNA einlagern, oder über sequenz-spezifische Sonden (Wilhelm and Pingoud 2003).

Die gängigsten Detektionsformate sind folgende:

Ethidiumbromid

Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen den Basenpaaren doppelsträngiger DNA interkaliert (Higuchi, Dollinger et al. 1992). Nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 250 nm wird sichtbares Licht der Wellenlänge 605 nm emittiert (Bonasera, Alberti et al. 2007).

SYBR Green I

SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff der sich sequenzunabhängig in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Die Bindungsstärke ist dabei 100-mal höher als die von Ethidiumbromid. Die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffes ist etwa 1000-fach höher, als die des ungebundenen und hat bei einer Wellenlänge von 520 nm seine maximale Fluoreszenzemission (Wilhelm and Pingoud 2003; Navarro, Serrano-Heras et al. 2015).

Werden **sequenz-spezifische Sonden** eingesetzt, wird der Effekt des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) ausgenutzt. Dabei werden die Sonden, d.h. die Oligonukleotide, mit Fluorochromen markiert und die vom PCR-Produkt abhängige Zunahme der Fluoreszenz durch den FRET beziehungsweise die Abnahme der Fluoreszenz durch Fluoreszenzlöschung gemessen. Beim FRET kommt es zur Übertragung von Energie eines Donor- oder Reporter-Fluorochroms, das mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wurde auf ein Akzeptor-Fluorochrom, welches ein Fluoreszenzsignal emittiert bzw. bei der Fluoreszenzlöschung zur Übertragung auf einen sogenannten Quencher, der zur Unterdrückung des Fluoreszenzsignals führt. Der FRET und die Fluoreszenzlöschung sind stark vom Abstand der beiden Fluorochrome abhängig. Dies wird genutzt um eine vom PCR-Produkt abhängige Veränderung des Abstands der beiden Fluorochrome erzeugtes Signal zu generieren (Wilhelm and Pingoud 2003).

Hybridisierungssonden

Hybridisierungssonden sind die einzige Detektionsmethode bei der der FRET direkt gemessen wird. Die Donor-Sonde ist am 3'-Ende des Oligonukleotids mit einem Reporter-Fluorochrom markiert, die Akzeptor-Sonde am 5'-Ende. Nur das Donor-Fluorochrom wird mit Licht angeregt, sodass frei gelöste Moleküle kein Fluoreszenzsignal abgeben. Während des Annealings lagern sich die beiden Sonden in direkter Umgebung an die Zielsequenz an. Durch die Annäherung kommt es zum Energieaustausch mittels FRET und zur Emission des Akzeptor-Fluorochroms (Wilhelm and Pingoud 2003; Navarro, Serrano-Heras et al. 2015).

Hydrolysesonden

Hydrolysesonden sind Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom markiert sind und innerhalb der Sonde oder am 3'-Ende mit einem Quencher. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz. Die Sonde lagert sich im Bereich der Zielsequenz an den DNA-Einzelstrang an. Während der Elongation kommt es durch die Taq-Polymerase zur Hydrolyse der Sonde und damit zur Trennung von Quencher und Reporter-Fluorochrom, welches nach Anregung mit Licht ein Fluoreszenzsignal sendet (Heid, Stevens et al. 1996; Wilhelm and Pingoud 2003; Navarro, Serrano-Heras et al. 2015).

Molecular Beacons

Molecular Beacons sind Oligonukleotide, die an einem Ende mit einem Reporter-Fluorochrom, am anderen Ende mit einem Quencher verbunden sind. Nur der mittlere Teil der Sonde ist komplementär zur Zielsequenz, während die beiden Enden zu sich selbst komplementär sind. Damit nimmt die Sonde in ungebundenem Zustand eine Haarnadelstruktur (stem-loop structure) an, bei der Reporter und Quencher in unmittelbarer Nähe sind und es zu einer Fluoreszenzlöschung kommt. Während des Annealings bindet die Schleife der Sonde an die Zielsequenz und durch die Vergrößerung des Abstands zwischen

Reporter und Quencher kommt es zur Fluoreszenz (Wilhelm and Pingoud 2003; Navarro, Serrano-Heras et al. 2015).

Scorpion Primer

Scorpion Primer vereinigen die Funktion und Struktur von Molecular Beacons und Primern. Sie bilden in ungebundenem Zustand wie die Molecular Beacons eine Haarnadelstruktur, bei der Quencher und Reporter in unmittelbarer Nähe sind. Das 3'-Ende dient als Primer und die Schleife ist komplementär zu der dem Primer anschließenden Zielsequenz. Nach der Elongation kommt es zur Öffnung der Schleife und diese bindet an die Zielsequenz. Dadurch kommt es zur Trennung von Quencher und Reporter und damit zur Fluoreszenz (Wilhelm and Pingoud 2003; Navarro, Serrano-Heras et al. 2015).

1.3.4 Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die Amplifikation der Zielsequenz und zum Abschluss der PCR kann sich bei unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, aber auch bei sequenz-spezifischen Sonden wie Hybridisierungssonden oder Molecular Beacons eine Schmelzkurvenanalyse anschließen. Während bei sequenz-spezifischen Sonden die Schmelzkurvenanalyse vor allem zur Genotypisierung und Mutationsanalyse dient, wird sie bei SYBR Green I zur Überprüfung der amplifizierten PCR-Produkte verwendet, weil über diese durch die unspezifische Einlagerung des Farbstoffes in doppelsträngige DNA während des Amplifikationsvorgangs keine Aussage getroffen werden kann (Wilhelm and Pingoud 2003). Bei der Schmelzkurvenanalyse findet nach der Amplifikation eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz bei kontinuierlich steigender Temperatur statt. Dabei findet eine Abnahme der Fluoreszenz durch Auftrennung der DNA-Doppelstränge und Freiwerden des SYBR Green I statt. Jedes DNA-Fragment hat auf Grund seiner Länge, Sequenz und seines GC-Gehalts eine spezifische Schmelztemperatur, die durch eine plötzliche Abnahme der Fluoreszenz in der Schmelzkurve sichtbar wird. Unspezifische

Produkte wie Primer-Dimere haben dabei eine vom gewünschten PCR-Produkt abweichende Schmelztemperatur (Ririe, Rasmussen et al. 1997).

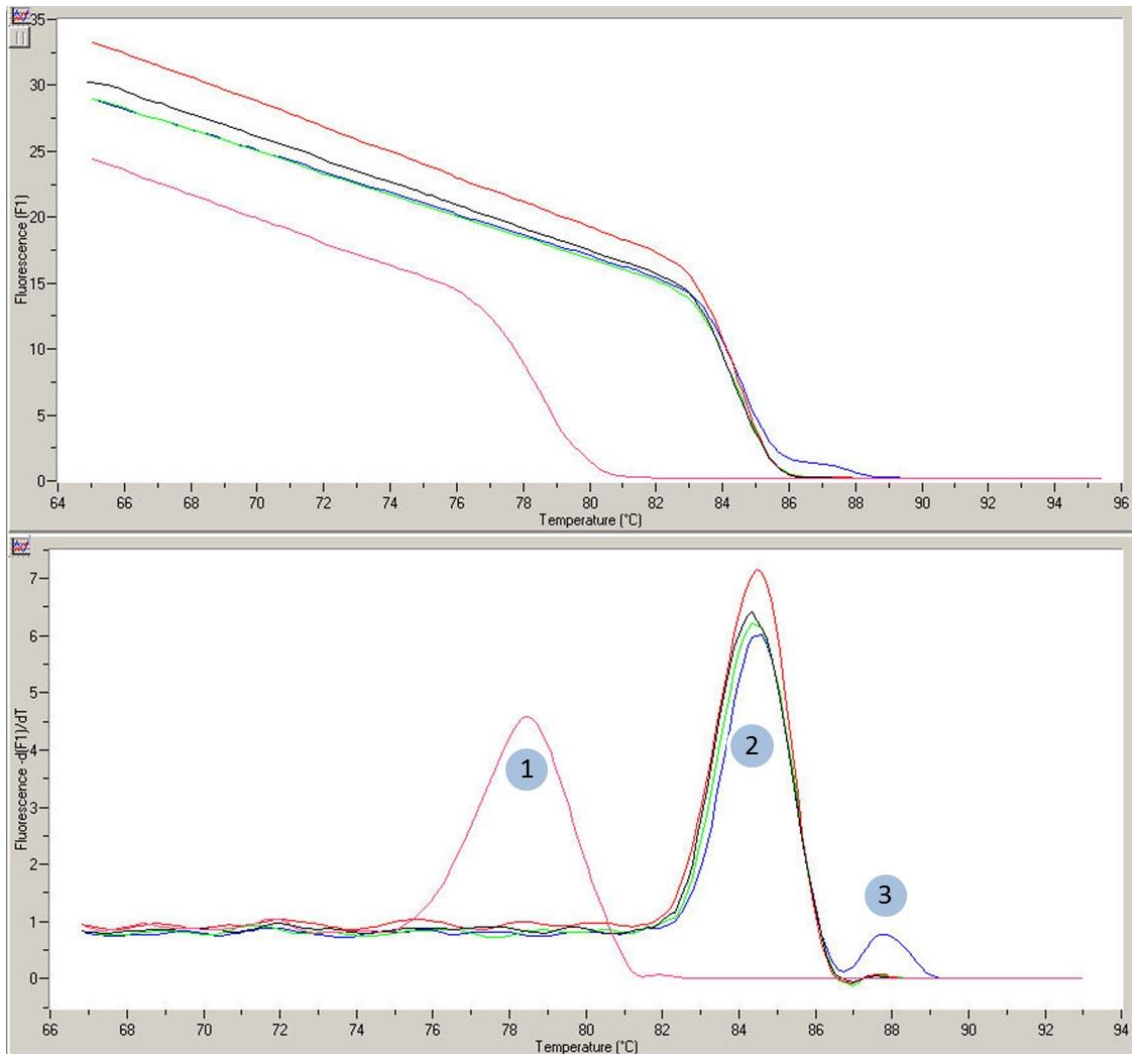


Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse; das obere Diagramm zeigt die kontinuierliche Abnahme des Fluoreszenzsignals bei steigender Temperatur mit plötzlicher Abnahme des Fluoreszenzsignals bei Erreichen der Schmelztemperatur der PCR-Produkte, das untere Diagramm zeigt die erste negative Ableitung des Fluoreszenzsignals mit Schmelzkurven-Spitzen (Peaks) für kurze unspezifische Produkte (Primerdimere) (1), spezifische Produkte (2) und lange unspezifische Produkte (3)

1.3.5 Absolute und relative Quantifizierung

Mit der real-time PCR sind grundsätzlich zwei Quantifizierungsstrategien möglich. Entweder eine absolute Quantifizierung zu einem Standard oder eine relative Quantifizierung zu einem Referenzgen (Wilhelm and Pingoud 2003). Die absolute Quantifizierung beruht dabei auf dem Vergleich der C_t -Werte einer

Standardverdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des Zielgens zur unbekannt Probe. Dabei ist allerdings die gleiche Amplifikationseffizienz und die Auswahl der Zielsequenz für die Genauigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung (Postollec, Falentin et al. 2011). Um dieses Problem zu umgehen, kann zusätzlich eine interne Kontrolle bei der PCR mitgeführt werden, wobei die gleichzeitige Analyse von zwei Produkten mittels unterschiedlichen Fluorochromen problembehaftet sein kann (Wilhelm and Pingoud 2003). Die relative Quantifizierung zu einem Referenzgen kann ebenfalls über einen externen Standard erfolgen (Postollec, Falentin et al. 2011). Viel genauer kann eine relative Quantifizierung allerdings über die Normalisierung durch einen Kalibrator durchgeführt werden. Wenn die Ergebnisse mithilfe einer korrigierten PCR-Effizienz berechnet werden, erhält man eine weitere Optimierung der Genauigkeit (Pfaffl 2001).

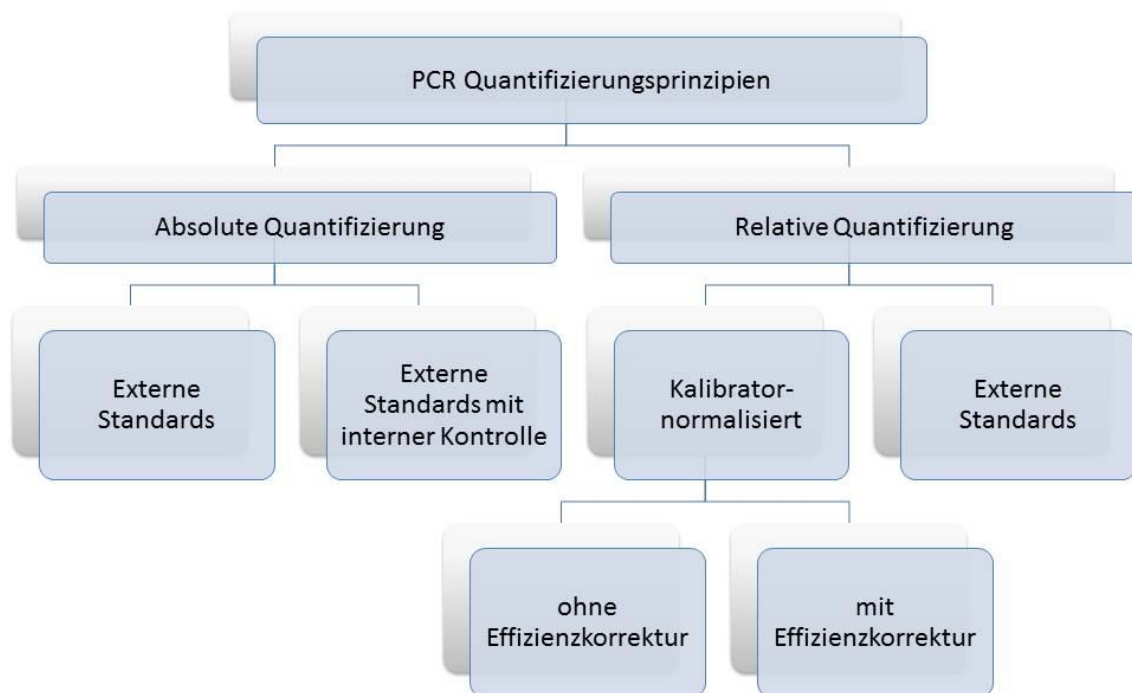


Abbildung 7: Übersicht der verschiedenen Quantifizierungsprinzipien bei der Real-time PCR

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, molekularbiologische Untersuchungsmethoden mittels quantitativer Real-time PCR in der Arbeitsgruppe zu etablieren. Hierzu gehörten die Auswahl der Referenz- und Zielgene, sowie der dazugehörigen Primer für die PCR. Des Weiteren sollten Standardkurven erstellt und die PCR-Bedingungen ermittelt und optimiert werden.

Im Anschluss sollten im Tissue-Engineering-Verfahren hergestellte Oral-Mukosa-Äquivalente auf ihre Genexpression untersucht werden um Aussagen über die Bildung einer Basalmembran und ihre Differenzierung machen zu können. Die Oral-Mukosa-Äquivalente wurden auf unterschiedlichen Scaffolds kultiviert und die Eignung der verschiedenen Scaffolds für einen potentiellen klinischen Einsatz überprüft.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Laborkits und Zellkulturmedien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Alfazyme	Invitrogen
Borsäure	Roth
dATP dCTP dGTP dTTP	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO)	sigma
Dispase II	Roche
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) + 10 % Fetales Kälberserum (FCS) + 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung + 0,1 % Fungizone-Lösung	Gibco, Invitrogen PAN Invitrogen Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagles Medium/Gerinnungsfaktor 12 (DMEM/HAM'S F12) + 10 % Fetales Kälberserum (FCS) + 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung + 0,1 % Fungizone-Lösung	Gibco, Invitrogen PAN Invitrogen Invitrogen
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco, Invitrogen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethanol	sigma

Green's Medium (1:1 Mischung aus DMEM und DMEM/HAM'S F12) + 10 % Fetales Kälberserum (FCS) + 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung + 0,1 % Fungizone-Lösung + 10 ng/ml Epidermal Growth Factor + 0,4 µg/ml Hydrocortison + 10 ⁻⁴ mol/l Adenin + 5 µg/ml Insulin + 5 µg/ml Transferrin + 2 x 10 ⁻⁷ mol/l Triiodothyronin	Gibco, Invitrogen PAN Invitrogen Invitrogen
LightCycler [®] FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I	Roche
Mercaptoethanol	sigma
M-MLV Reverse Transcriptase 5x Reaktionspuffer	Promega
M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant	Promega
Nuclease-freies Wasser	Promega
NucleoSpin [®] RNA II RA1-Puffer RA2-Puffer RA3-Puffer Membrane Desalting Buffer (MDB) rDNase Reaktionspuffer rDNase, RNase-frei RNase-freies H ₂ O	Macherey-Nagel
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega
peqGOLD 50 bp DNA-Leiter	PEQLAB
peqGold Universal Agarose	PEQLAB
RNasin [®] Plus RNase Inhibitor	Promega
SYBR Green I	sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth

2.1.2 Primer für die Real-time PCR mit dem Lightcycler 1.5 von Roche

Tabelle 2: Für die Real-time PCR verwendete Primer

Primer	Kodiertes Gen	Primerlänge (nt)	Nukleotidsequenz (5' nach 3')	Produktlänge (bp)
ACTB left	Referenzgen β -actin	18	CCAACCGCGAGAAGATGA	97
ACTB right	Referenzgen β -actin	20	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	97
G6PD left	Referenzgen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	20	GCAAACAGAGTGAGCCCTTC	90
G6PD right	Referenzgen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	19	GGCCAGCCACATAGGAGTT	90
GAPDH left	Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	19	AGCCACATCGCTCAGACAC	66
GAPDH right	Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	19	GCCCAATACGACCAAATCC	66
COL4A1 left	Kollagen IV	20	CGGGTACCCAGGACTCATAG	60
COL4A1 right	Kollagen IV	20	GGACCTGCTTCACCCTTTTC	60
KRT13 left	Keratin K13	20	CGAGAGCCTGAATGAAGAGC	80
KRT13 right	Keratin K13	20	CGACCACCTGGTTGCTAAAT	80
KRT14 left	Keratin K14	20	TTGAGAGCCTGAAGGAGGAG	70
KRT14 right	Keratin K14	20	CCTCTCAGGGCATTTCATCTC	70
LAMC1 left	Laminin 1	20	ACAGCGAGACCTGTGATCCT	86
LAMC1 right	Laminin 1	20	CCCATCACTGCACTTCTCAC	86
LAMC2 left	Laminin 5	20	GGGCAATGCCACTTTTTATG	65
LAMC2 right	Laminin 5	20	CCTGCAGGTCAAACCTCTCTG	65

Die Primer wurden alle von der Firma TIB MOLBIOL aus Berlin bezogen.

2.1.3 Zellträger (Scaffolds)

TissuFoil E (TFE) (Baxter GmbH)

TissuFoil E besteht aus hochgereinigten equinen Kollagen-I Fibrillen und wurde ursprünglich als chirurgischer Wundverband und Gewebersatz entwickelt (Schonleben, Reck et al. 2006).

Dermal Regeneration Template (DRT) Single Layer (Integra NeuroSciences GmbH)

Dermal Regeneration Template besteht aus quervernetztem Kollagen-I Fibrillen aus Rindersehnen und Glycosaminoglycan (Chondroitin-6-Sulfat) mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 30-120 µm. Die Membran dient als Leitstruktur zur Einwanderung von Zellen und zur Einsprossung von neuen Gefäßen, sowie als Gerüst zur Ablagerung von natürlichem Kollagen. Sie ist natürlich abbaubar und wird bei Verbrennungen, sowie zur rekonstruktiven Chirurgie verwendet (Ojeh, Frame et al. 2001; Khan, Ali et al. 2010).

2.2 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Biometra, BioDocAnalyze	UV-Transilluminator
Biometra, Compact M	Elektrophoresesystem
Eppendorf 10, 20, 100, 200, 1000	Pipetten
Eppendorf, Thermomixer 5436	Thermoblock
Heidolph MR 3001	Magnetrührer
Heraeus Hera Cell	Zellkulturschrank
Heraeus, Biofuge Pico	Tischzentrifuge
Heraeus, Hera Safe	Sterile Werkbank
Invitrogen	Stromversorgung für Elektrophoresesystem
Julabo, GFL	Wasserbad
Kern, KB	Präzisionswaage

KNF Neuberger	Absaugpumpe
Labnet, Spektrafuge Mini	Tischzentrifuge
Mini Rocker MR-1	Schütteltisch
NucleoSpin [®] RNA II Filter und Säulen	Filter und Säulen für die RNA Isolierung
Olympus CK40, Leitz DM RBE	Lichtmikroskop
Peqlab Nanodrop Spectrophotometer 2000c	Photometer
Roche Lightcycler 1.5	Real-time PCR
Scientific Industries, Vortex Genie 2	Vortexgerät

2.3 Verwendete Software

Tabelle 4: Verwendete Software

Programm	Hersteller	Verwendung
Primer3	Open Source	Primerdesign
EndNote X5	Thomson Reuters	Literaturverwaltung
Microsoft Office 2010	Microsoft	Textverarbeitung Tabellenkalkulation
SPSS	IBM	Statistische Auswertung
Relative Quantification Software 1.0	Roche	Erstellung der Koeffizienten-Dateien und Auswertung der Proben
Lightcycler Software 3.5	Roche	Analyse der Proben

2.4 Patienten und Untersuchungsmaterial

Für die Zellkulturversuche dieser Arbeit wurden Mundschleimhautproben von Patienten der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Würzburg verwendet. Diese wurden, nach schriftlicher Aufklärung und Zustimmung durch die Patienten, bei oral- und kieferchirurgischen Eingriffen entnommen und es wurde umgehend mit der Zellisolation begonnen. Die Patienten waren zwischen 16 und 60 Jahren alt. Die

Proben, der sowohl weiblichen als auch männlichen Patienten, wurden zwischen September 2008 und April 2009 entnommen. Die Größe der Mundschleimhautprobe betrug ca. 5 mm x 5 mm. Die Entnahme der Mundschleimhautproben wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Votum 39/07).

2.5 Gewinnung von humanen Fibroblasten und Keratinozyten

Zur Gewinnung der Fibroblasten und Keratinozyten wurden die in 2.4 genannten Mundschleimhautproben mit 70 % Ethanol für fünf Minuten desinfiziert und anschließend dreimal mit DPBS für jeweils fünf Minuten gewaschen. Danach wurden die Mundschleimhautproben mit einem Skalpell in Bindegewebe und Epithel aufgetrennt. Zur Gewinnung der Fibroblasten wurde das Bindegewebe, zur Gewinnung der Keratinozyten das Epithel in kleinere Stücke zerteilt und anschließend in Kulturgefäßen mit DMEM/F12 Medium, sowie 10 % FCS, 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 0,1 % Fungizone-Lösung in einem Zellkulturschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach wenigen Tagen begannen die Zellen aus den Proben herauszuwachsen. Bei den Fibroblasten wurde nach sieben bis zehn Tagen die Gewebeprobe entfernt und nach einigen weiteren Tagen die Zellen geerntet und entweder weiter passagiert oder für die Zellkulturversuche verwendet.

Die gewachsenen Keratinozyten hafteten sehr stark aneinander, sodass sie mit 5 ml Alfasyme aus der Kulturschale gelöst und um Einzelzellen zu erhalten die zusammenhängenden Zellen in 0,5 ml Dispase II (240 Units/100 ml) für 15-20 Minuten bei 37 °C inkubiert werden mussten. Durch mehrfache Resuspension in einer Pipette wurden die Zellen getrennt und für die weitere Verwendung vorbereitet.

2.6 Besiedelung der Scaffolds

2.6.1 Kultivierung von Fibroblasten (Dermal-Äquivalente)

Zur Herstellung der Dermal-Äquivalente wurden die Fibroblasten isoliert auf die Zellträger (Scaffolds) gebracht. Damit eine Kultivierung in 12-Well Platten möglich war, wurden die Zellträger unter sterilen Bedingungen in 1 cm x 1,3 cm große Stücke geschnitten und danach in das Zellkulturgefäß eingebracht. Um den Zellträger zu fixieren und gleichzeitig ein Anwachsen der Fibroblasten auf der epidermalen Seite des Zellträgers zu erreichen, wurde dieser mit einem zellkulturkompatiblen Rahmen aus Polystyrol und zusätzlich einem Metallring beschwert (Abbildung 8). Die Fibroblasten wurden mit 0,5 ml DMEM/F12 innerhalb des Rahmens aufgebracht und einen Tag im Zellkulturschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Am folgenden Tag wurden der Rahmen und der Metallring entfernt. Anschließend wurden die Zellträger für weitere 6-20 Tage kultiviert und alle zwei bis drei Tage das Medium durch frisches Medium ersetzt.

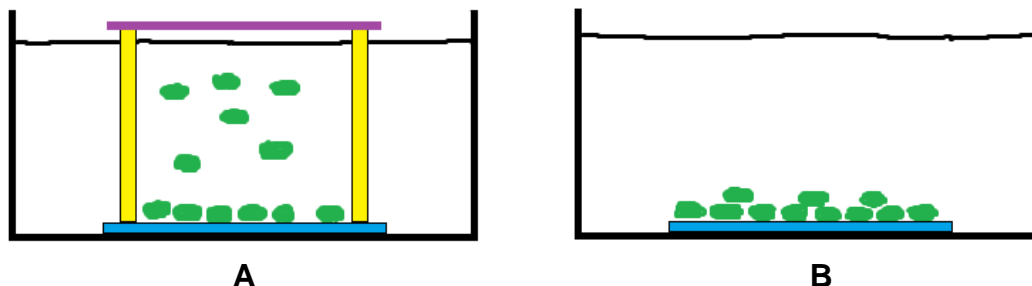


Abbildung 8: Aufbringen der Fibroblasten (grün) auf den Zellträger (blau) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb), der durch einen Metallring (lila) beschwert wird (A) und Fibroblastenkultur nach Entfernung des Rahmens (B)

2.6.2 Kultivierung von Fibroblasten und Keratinozyten (Oral-Mukosa-Äquivalente)

Zur Herstellung der Oral-Mukosa-Äquivalente wurden den Kulturen aus Fibroblasten nach sieben Tagen Keratinozyten auf der Oberfläche hinzugefügt

(Abbildung 9). Wie bei den Dermal-Äquivalenten wurden die Zellträger während des ersten Tages mit einem Rahmen und einem Metallring beschwert. Anschließend wurden die Zellträger für weitere 6-13 Tage in Green's Medium kultiviert. Dabei wurde das Medium alle zwei bis drei Tage durch frisches ersetzt. Es wurde Green's Medium verwendet, weil die Keratinozyten in diesem Medium besser aneinander haften und differenzieren können, sodass eine homogene Zelloberfläche entsteht.

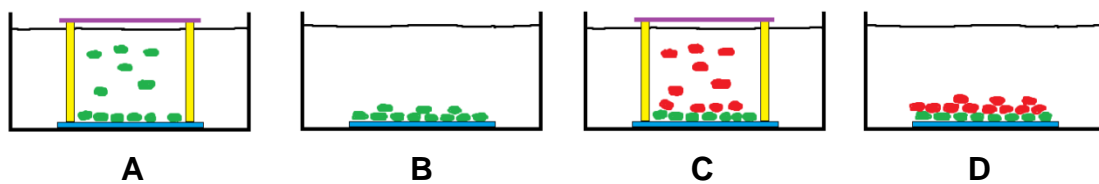


Abbildung 9: Aufbringen der Fibroblasten (grün) auf den Zellträger (blau) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb), der durch einen Metallring (lila) beschwert wird (A), Fibroblastenkultur nach Entfernung des Rahmens (B), Aufbringen der Keratinozyten (rot) auf die Fibroblastenkultur (grün) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb) und Metallring (lila) (C), Fibroblasten- und Keratinozytenkultur nach Entfernung des Rahmens (D)

2.6.3 Kultivierung von Keratinozyten (Epidermal-Äquivalente)

Zur Herstellung der Epidermal-Äquivalente wurden die Keratinozyten isoliert auf die Zellträger (Scaffolds) gebracht (Abbildung 10). Das Vorgehen unterscheidet sich gegenüber der Dermal-Äquivalenten-Kultivierung (2.6.1) nur im verwendeten Medium. Dabei wurde wie zur Herstellung der Oral-Mukosa-Äquivalente (2.6.2) Green's Medium verwendet.

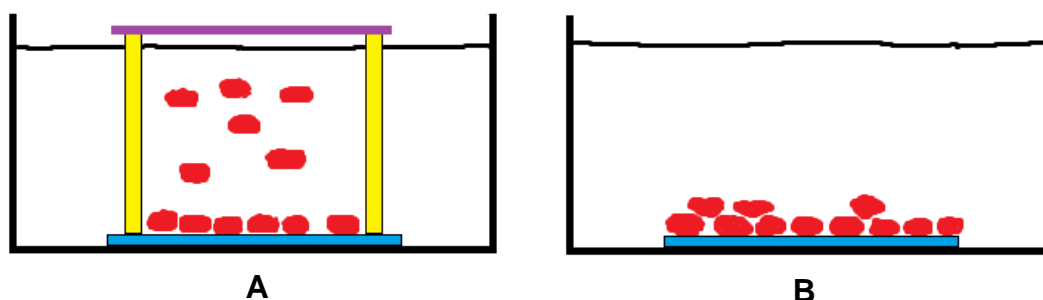


Abbildung 10: Aufbringen der Keratinozyten (rot) auf den Zellträger (blau) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb), der durch einen Metallring (lila) beschwert wird (A) und Keratinozytenkultur nach Entfernung des Rahmens (B)

2.7 Isolierung der RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das Labor-Kit "NucleoSpin® RNA II" von Macherey-Nagel verwendet. Dabei wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Mörser zu einem feinen Pulver zerstoßen. Dieses wurde in 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl Mercaptoethanol gelöst und anschließend in einer Zentrifuge bei 11000 Umdrehungen/min in einem NucleoSpin® Filter für eine Minute filtriert. Der Lösung wurde 350 µl Ethanol (70 %) hinzugefügt und mit einer Pipette mehrmals resuspendiert bevor sie zur Bindung der RNA auf eine NucleoSpin® RNA II Säule gegeben und diese bei 11000 Umdrehungen/min für 30 Sekunden zentrifugiert wurde. Zur Entsalzung der Säulenmembran wurden 350 µl MDB hinzugefügt und nochmals bei 11000 Umdrehungen/min für eine Minute zentrifugiert und damit die Membran und die darin gebundene RNA getrocknet und für den folgenden rDNase-Verdau vorbereitet. Dafür wird eine rDNase Reaktionsmischung aus 10 µl rDNase und 90 µl rDNase Reaktionspuffer hergestellt und 95 µl dieser Mischung in die Mitte der Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Reinigung der membrangebundenen RNA wird auf die Säule 200 µl RA2-Puffer gegeben und bei 11000 Umdrehungen/min für 30 Sekunden zentrifugiert. Durch den RA2-Puffer wird die rDNase inaktiviert. Bei den zwei folgenden Waschungen wurde die Säule zuerst mit 600 µl RA3-Puffer beschickt und bei 11000 Umdrehungen/min für 30 Sekunden zentrifugiert und anschließend nochmals mit 250 µl RA3-Puffer beschickt und bei 11000 Umdrehungen/min für zwei Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 11000 Umdrehungen/min für eine Minute aus der Membran gelöst.

2.8 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Probe in einen Nanodrop ND-2000c gegeben und die Absorption von Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ bestimmt. Die

Konzentration wird mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt, welches für die RNA-Konzentrationsbestimmung folgenderweise modifiziert wird:

$$c = \frac{A \cdot \varepsilon}{b}$$

- c = RNA-Konzentration in ng/ μ l
 A = Absorption in AU (absorbance units)
 ε = wellenlängenassoziierter Extinktionskoeffizient in ng·cm/ μ l,
der Extinktionskoeffizient für RNA beträgt 40 ng·cm/ μ l bei
 $\lambda = 260$ nm
 b = Messstrecke in cm

Der Quotient der Absorption bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gibt den Reinheitsgrad der RNA an und sollte ~2,0 betragen (Desjardins and Conklin 2010).

2.9 Herstellung von cDNA aus RNA

Zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) aus der Gesamt-RNA wurde das Enzym M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant von Promega verwendet. Zu Beginn wurden 0,2 μ g RNA mit 0,5 μ g Oligo(dT)₁₅ Primer von Promega in einem Gesamtvolumen von 14 μ l Nuclease-freiem Wasser vermischt und zuerst bei 70 °C für fünf Minuten erhitzt und danach für fünf Minuten auf Eis gekühlt um zunächst Sekundärstrukturen aufzubrechen und dann deren Neubildung zu verhindern. Damit sich die Lösung am Boden des Gefäßes sammelt, wurde kurz zentrifugiert und anschließend 5 μ l M-MLV RT 5x Reaktionspuffer, 1,25 μ l dNTP 10 μ M, 1 μ l M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant sowie 1 μ l RNasin Plus RNase Inhibitor hinzugefügt und mit Nuclease-freiem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 25 μ l aufgefüllt. Der gesamte Ansatz wurde dann bei

42 °C für eine Stunde inkubiert und abschließend nochmals bei 70 °C für 15 Minuten erhitzt um das Reaktionsgemisch zu inaktivieren. Die cDNA wurde bei -20 °C eingefroren und gelagert.

2.10 Auswahl der PCR-Primer

Zur Auswahl der Primer für die Real-time PCR wurde das Open Source Programm Primer3 verwendet. Dadurch konnte der GC-Gehalt mit ca. 50 %, die Primerlänge mit ungefähr 18-22 Basenpaaren und die Länge des PCR-Produktes mit 60-100 Basenpaaren optimal gewählt werden. Die Schmelztemperatur wurde bei ca. 60 °C bestimmt. Für eine optimale Amplifikation wurden Ähnlichkeiten zwischen Forward- und Reverse-Primer und Palindrom-Sequenzen vermieden. Außerdem wurde bei den Primern das Intron-/Exon-Spanning beachtet, um bei einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA eine Amplifizierung derselben auszuschließen.

2.11 Auswahl des Referenzgens

Bei der Auswahl des Referenzgens zur relativen Quantifizierung mittels Real-time PCR ist es wichtig, dass das Referenzgen bei allen untersuchten Proben konstant exprimiert wird. Um diesen Sachverhalt zu testen, wurden bei einer typisch positiven Probenreihe verschiedene Referenzgene ins Verhältnis zu einem Zielgen gesetzt. Nach Interpretation der Verhältnismuster (siehe 3.3) der verschiedenen Referenzgene stellten sich β -Actin und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als geeignet heraus, von denen dann β -Actin für die weiteren Versuche verwendet wurde.

2.12 Standardkurven und Bestimmung der Effizienz

Da die PCR-Effizienz für jeden Primer und unterschiedliche RNA-Ausgangsmengen verschieden sein kann, muss für eine exakte Auswertung der Ergebnisse die PCR-Effizienz bei allen Primern und RNA-Ausgangsmengen

bekannt sein und in die Berechnung der Ergebnisse mit einfließen. Dies geschah mittels Standardkurven, die sowohl für Referenz- als auch Zielgene angefertigt wurden. Die Standardkurven waren Verdünnungsreihen einer typisch positiven Probe über den Konzentrationsbereich aller zu untersuchenden Proben und enthielten vier Verdünnungsschritte über vier Zehnerpotenzen bei vier Replikaten je Verdünnungsschritt.

Die Auswertung erfolgte mit der Relative Quantification Software 1.0 von Roche, wobei für jedes Zielgen ein sogenanntes Coefficient-File aus der Standardkurve des Referenzgens und des Zielgens erstellt wurde. Zunächst wurden die Standardkurven als *.txt-Dateien aus der Lightcycler Software 3.5 exportiert und dann unter Verwendung folgender Optionen mit der Relative Quantification Software ein Coefficient-File erzeugt:

- Type of experiment → dual color
- RelQuant options → create fit coefficient files
- Create fit coefficient files → fit by using exported LCDA file

Die Software errechnet für jeden Konzentrationsbereich der Standardkurven einen Effizienzkorrektur-Koeffizienten, der im Coefficient-File gespeichert wird und berechnet diesen bei der späteren Auswertung der Proben in das Ergebnis mit ein.

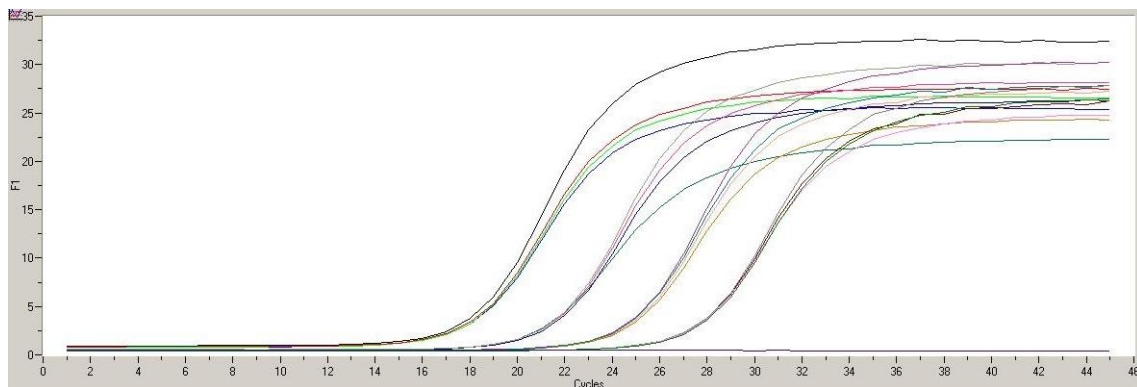


Abbildung 11: Fluoreszenzsignal einer Standardkurve mit jeweils vier Replikaten der vier Verdünnungsschritte und einer Negativkontrolle

2.13 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Amplifikationsprodukte wurde nach Einstellung der endgültigen PCR-Bedingungen für jedes zu untersuchende Gen exemplarisch eine Gelelektrophorese durchgeführt. Damit sollten die untersuchten Proben auf Kontaminationen, Primerdimere und falsche Amplifikationsprodukte getestet werden und eben solche, bis auf die Primerdimere bei den Negativkontrollen, ausgeschlossen werden.

Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld zur Anode. Dieses Verhalten wird bei der Gelelektrophorese ausgenutzt, wobei kleine DNA-Moleküle schneller durch das Gel zur Anode wandern als große.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde zunächst ein 5 x TBE-Puffer hergestellt, der zur Lösung der Agarose und auch als Laufpuffer diente. Dieser wurde aus 54 g TRIS, 27,5 g Borsäure und 20 ml EDTA 0,5 M pH 8 angemischt, dann bis ein Liter Gesamtvolumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt und zur weiteren Verwendung auf 0,5 x TBE mit destilliertem Wasser verdünnt. Es wurden 1,75 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE aufgeköcht bis die Agarose sich vollständig gelöst hatte und nach kurzem Abkühlen in den Gelformer mit einem Kamm für die Geltaschen gegossen, wo es für 30 Minuten auspolymerisierte.

Als Marker wurde die peqGOLD 50 bp DNA-Leiter verwendet, welche aus 1 µl DNA-Leiter, 1 µl 6 x Ladepuffer, 4 µl doppeldestilliertem Wasser und 0,5 µl SYBR Green I vorgemischt wurde. Für die Untersuchung wurden 8 µl der DNA-Probe mit 1,6 µl 6 x Ladepuffer und 1 µl SYBR Green I vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte bei 100 V für 75 Minuten.

SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert und diese unter UV-Licht sichtbar macht. Zur Auswertung der Agarosegele wurde der BioDocAnalyse UV-Transilluminator von Biometra verwendet, mit welchem die Gele betrachtet und fotodokumentiert wurden.

2.14 Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)

Zur Durchführung der Real-time PCR wurde der Lightcycler 1.5 und die Lightcycler Software 3.5 verwendet.

Das Prinzip der PCR beruht auf der Messung geringer Mengenunterschiede von Nukleinsäuren durch mehrfache Replikation bestimmter Aminosäuresequenzen aus vorhandener cDNA. Dabei sind wie in 1.3.2 beschrieben drei Schritte zur Duplikation nötig.

Detektiert wurde der Anstieg der PCR-Produkte über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welcher sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert und nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 497$ nm, Licht der Wellenlänge $\lambda = 520$ nm emittiert. Eine solche Messung fand nach jedem PCR-Zyklus statt und so konnte die Messung der Zunahme der PCR-Produkte in Echtzeit erfolgen.

Zur Durchführung eines PCR-Laufes wurde standardmäßig ein Reaktionsansatz des LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I mit folgenden Reagenzien für 20 μ l-Kapillaren vermischt:

- Master Mix, 5x conc. 4 μ l
- Primer (5 μ M) 2 μ l
- DMSO 1 μ l
- H₂O (PCR-grade) 8 μ l
- Template (Probe) 5 μ l (1:10 Verdünnung der Proben-cDNA)

Es wurden folgende Standard-PCR-Bedingungen verwendet, welche in der Amplifikationsphase den verschiedenen Primern angepasst wurden:

Tabelle 5: Standard-PCR-Bedingungen

Analyse-Modus	Zyklen-anzahl	Segment	End-temperatur (°C)	Heizrate (Kelvin/s)	Dauer (s)
Aktivierung					
kein	1		95	20	600
Amplifikation					
Quantification	45	Denaturierung	95	20	10
		Annealing	60-65	20	3-5
		Elongation	68-72	20	3-4
Schmelzkurve					
Melting Curves	1	Denaturierung	95	20	0
		Annealing	65	20	60
		Schmelzen	95	0,1	0
Abkühlung					
kein	1		40	20	30

Modifikation der PCR-Bedingungen in der Amplifikationsphase:

Tabelle 6: PCR-Bedingungen in der Amplifikationsphase

Primer	Denaturierung		Annealing		Elongation	
	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Temperatur (°C)	Dauer (s)
β-Actin	95	10	65	3	68	4
Kollagen IV	95	10	65	3	72	3
Laminin 1	95	10	65	3	72	4
Laminin 5	95	10	60	5	72	4
Keratin K13	95	10	65	3	72	3
Keratin K14	95	10	65	3	72	3

2.14.1 Beladungsschema

Für die spezielle Berechnung der Ergebnisse war es notwendig, ein gleichbleibendes Beladungsschema des Proben-Karussells des Lightcyclers beizubehalten, d.h. ein und dieselbe Probe wurde zur Untersuchung immer an der selben Position des Karussells positioniert, sowohl für das Referenzgen als auch für alle Zielgene. Nur so kann das Berechnungsprogramm Relative Quantification Software ein Dual-Color-Experiment ausführen, welches normalerweise nur über eine Mehrkanaldetektion mit Sonden möglich ist.

2.14.2 Kalibrator

Um Unterschiede in den einzelnen PCR-Läufen und Chargen-Unterschiede der Reagenzien auszugleichen wurde ein Kalibrator verwendet. Der Kalibrator ist eine für Referenz- und Zielgen typisch positive Probe, die in jedem Lauf mitquantifiziert wird und dadurch das Ergebnis auf den Kalibrator normalisiert. Das normalisierte Verhältnis zwischen Referenz- und Zielgen berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Normalisiertes Verhältnis} = \frac{\text{Quotient Zielgen (Probe)}/\text{Referenzgen (Probe)}}{\text{Quotient Zielgen (Kalibrator)}/\text{Referenzgen (Kalibrator)}}$$

2.14.3 DMSO

Um eine Ausbildung von Sekundärstrukturen in der Proben-DNA zu verhindern, wurde den PCR-Ansätzen 5 % DMSO zugesetzt. Dieses farb- und geruchslose Lösungsmittel, welches die Interaktion der DNA unterbindet, verbessert die Amplifikationseffizienz insbesondere in GC-reichen Regionen.

2.14.4 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse ist wie in 1.3.4 beschrieben ein wichtiges Instrument um am Ende eines PCR-Laufes zu überprüfen, ob die gewünschten Produkte amplifiziert wurden. Jedes PCR-Produkt und jeder Primer hat einen spezifischen Schmelzpunkt, an dem 50 % der DNA als Einzelstränge vorliegen. Dieser Schmelzpunkt ergibt sich aus den physikalischen Eigenschaften der DNA. So können unspezifische Produkte wie Primerdimere von gewünschten spezifischen PCR-Produkten unterschieden werden, da diese meist einen wesentlich höheren Schmelzpunkt besitzen als die unspezifischen Produkte. Zur Durchführung der Schmelzkurvenanalyse wurde nach 45 Zyklen im „Melting Curves“ Modus eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung bei einer stetigen Temperaturzunahme von 0,1 Kelvin/Sekunde durchgeführt und im Anschluss

ausgewertet. Die Auswertung der Schmelzkurve erfolgte über ihre erste negative Ableitung. So können die spezifischen Schmelztemperaturen an den Schmelzkurven-Spitzen (Peaks) abgelesen werden.

2.15 Berechnung der Verhältnisse (Ratios)

Zur Berechnung der Ratios wurde die Relative Quantification Software 1.0 von Roche verwendet. Unter Beachtung des unter 2.14.1 beschriebenen Beladungsschemas wurden nach der Auswertung der Proben mit dem Lightcycler zunächst die Daten aus der Lightcycler Software 3.5 als *.txt-Datei exportiert und dann zusammen mit den jeweiligen Coefficient-Files unter Verwendung folgender Einstellungen in die Relative Quantification Software importiert:

- Type of experiment → dual color
- RelQuant options → analysis
- Analysis → use coefficient file
→ duplicate
(da 2 Kopien der jeweiligen Proben untersucht wurden)

Anschließend wurden die exportierten Dateien der Untersuchung, sowie das Coefficient-File geöffnet und die Positionen des Kalibrators und der Proben im Probenkarussell eingegeben. Nach Bestätigung der Daten konnten die normalisierten Ratios in einer Tabelle abgelesen und gespeichert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Konzentration der RNA

Für die Untersuchung der Proben mittels PCR wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den unterschiedlich kultivierten Mundschleimhautzellen isoliert und photometrisch die Konzentration bestimmt. Hier zeigten sich sowohl zwischen Dermal Regeneration Template (DRT) und TissuFoil E (TFE) als auch zwischen den Mono- und den Kokulturen deutliche Unterschiede in der RNA-Konzentration. Die Monokulturen bestehend aus Fibroblasten, die 21 Tage kultiviert wurden bzw. Keratinozyten, die 14 Tage kultiviert wurden, entsprechen in Zelltyp und Kultivierungszeit der Kokultur von Fibroblasten, denen nach 7 Tagen Keratinozyten hinzugefügt und für weitere 14 Tage kultiviert wurden (F 21 + K 14 Kultur). Die Summe der RNA-Konzentration der Monokulturen liegt jedoch bei beiden Scaffolds deutlich unter der RNA-Konzentration der F 21 + K 14 Kultur, was auf eine höhere Zellaktivität und eine höhere Proteinausschüttung bei den Kokulturen schließen lässt, die mittels PCR verifiziert werden sollte. Selbst die F 14 + K 7 Kulturen hatten schon eine höhere RNA-Konzentration als die Summe der beiden Monokulturen (Abbildung 12). In Bezug auf die verschiedenen Scaffolds zeigten die Kulturen auf DRT insgesamt eine deutlich höhere RNA-Konzentration, wobei sich insbesondere bei der Keratinozyten-Monokultur auf TFE nur so geringe Konzentrationen an RNA isolieren ließen, dass keine Herstellung von cDNA zur weiteren Untersuchung mittels PCR möglich war.

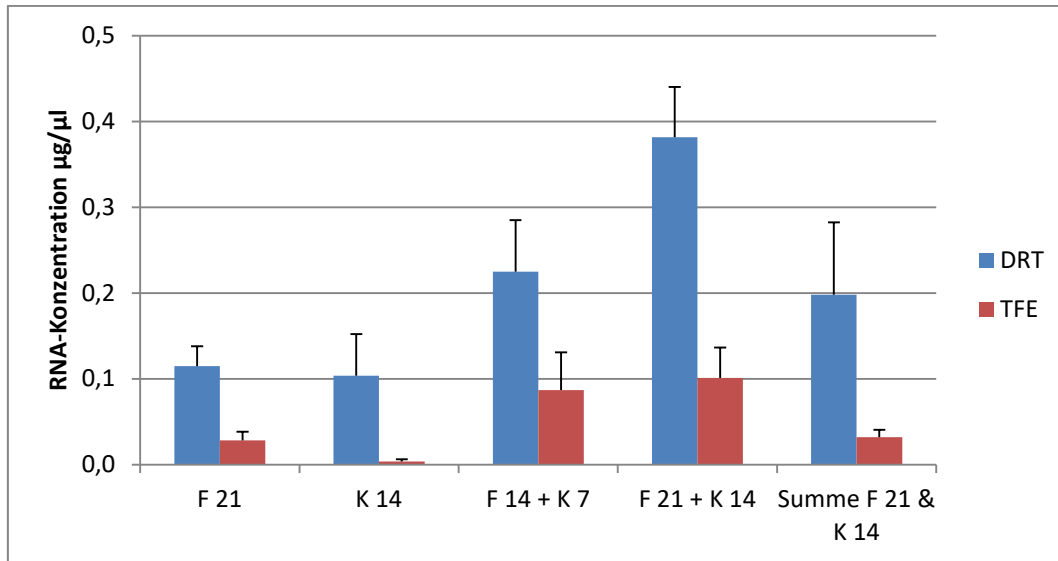


Abbildung 12: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der RNA-Konzentrationen in µg/µl für die unterschiedlich kultivierten Proben auf DRT und TFE und die Summe der Monokulturen

3.2 Einstellen der Primerbedingungen

Um eine möglichst genaue Quantifizierung der Genexpression zu erreichen, müssen die Bedingungen für die Primer jeweils optimiert eingestellt werden. Nur so sind eine spezifische Amplifikation und eine hohe PCR-Effizienz möglich. Teil dieser Arbeit war auch die Etablierung von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden mittels Real-time PCR und damit auch die Optimierung der Primerbedingungen. Die Temperaturen und Haltezeiten für Annealing- und Extensions-Phase wurden in mehreren Vorversuchen optimiert. Für die einzelnen Einstellungsmöglichkeiten wurde folgendermaßen vorgegangen:

Annealing-Temperatur: Bei der Amplifikation von unspezifischen Produkten wurde die Temperatur in Schritten von 1 - 2 Kelvin erhöht um eine spezifischere Anlagerung der Primer zu erreichen.

Annealing-Zeit: Entstanden keine Produkte oder war die PCR-Effizienz gering, wurde die Zeit in 1s-Schritten erhöht, entstanden unspezifische Produkte wurde die Zeit verringert.

Extensions-Temperatur: Die Standard-Temperatur von 72 °C wurde nur bei der Entstehung von unspezifischen Produkten verringert, wenn sich diese nicht durch Veränderung der Annealing-Bedingungen verhindern ließen.

Extensions-Zeit: Die Extensions-Zeit wurde abhängig von der Länge der Zielsequenz gewählt. Es wurde für jeweils 25 Basenpaare Zielsequenzlänge eine Sekunde Extensionszeit gewählt.

Anschließend wurden für die einzelnen Gene die durchschnittlichen PCR-Effizienzen berechnet (Tabelle 7). Dies erfolgte mittels der Lightcycler Software 3.5 aus den Steigungen der C_t-Werte der Standardverdünnungsreihen über vier Zehnerpotenzen.

Die PCR-Effizienzen errechnen sich über die Formel: $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$
(Pfaffl 2004)

Tabelle 7: PCR-Effizienzen für die einzelnen Gene

Gen	PCR-Effizienz
β-Actin	E = 2,06
Kollagen IV	E = 2,12
Laminin 1	E = 1,96
Laminin 5	E = 1,94
Keratin K13	E = 1,94
Keratin K14	E = 1,97

3.3 Auswahl des Referenzgens

Entscheidend für eine relative Quantifizierung mittels Real-time PCR ist die Auswahl eines geeigneten Referenzgens. Das Referenzgen ist für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion essentiell und muss in allen unterschiedlich behandelten Proben auf gleichem Niveau ausgeschüttet werden (Huggett, Dheda et al. 2005). Um diese Voraussetzungen zu erfüllen wurden sowohl die beiden Monokulturen als auch die beiden Kokulturen auf die Expressierung unterschiedlicher Referenzgene untersucht. Dabei wurden stichprobenartig in

einer Probenreihe die unterschiedlich kultivierten Zellen auf die Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und β -Actin (ACTB) im Verhältnis zu einem Zielgen, in diesem Fall Kollagen IV (COL4A1), untersucht (Abbildung 13).

Damit ein Referenzgen als geeignet erscheint, müssen die Verhältnisse von mindestens zwei Referenzgenen in der Probenreihe ein gleiches Verhältnismuster zeigen. Dabei spielt es keine Rolle, dass die cDNA-Ausgangsmenge in diesen Fällen unbekannt ist, da es lediglich auf ein konstantes Muster bei den Verhältnissen der Referenzgene zum Zielgen ankommt. Es zeigte sich, dass sowohl β -Actin als auch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in den unterschiedlichen Proben wesentlich gleichmäßiger ausgeschüttet wurden als Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Die 14-tägige Keratinozytenkultur schüttete in manchen Fällen zu wenig Ziel- bzw. Referenzgen aus, sodass eine Quantifizierung in diesen Fällen nicht möglich war. Die Genexpressionsanalyse der Proben wurde mit dem Referenzgen β -Actin durchgeführt, da sich die Primer in den weiteren Versuchen als stabiler und einfacher in der Handhabung erwiesen hatten.

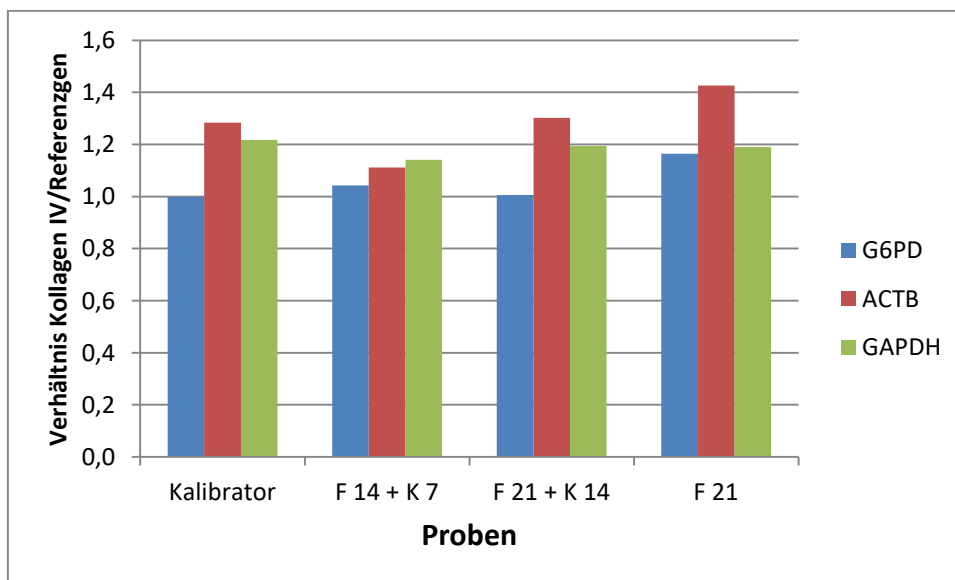


Abbildung 13: Verhältnismuster von Kollagen IV (COL4A1) zu den Referenzgenen β -Actin (ACTB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bei den unterschiedlich kultivierten Proben und für den Kalibrator

3.4 Genexpressionsanalyse mittels Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die unterschiedlich kultivierten Proben wurden wie beschrieben (2.14) auf ihre Genexpression untersucht und die Ratios mittels der Relative Quantification Software 1.0 berechnet. Da die relative Quantifizierung effizienzkorrigiert und normalisiert auf einen Kalibrator durchgeführt wurde, sind die berechneten Ratios miteinander vergleichbar. Für eine höhere Genauigkeit wurde die Quantifizierung jeweils mit einem Duplikat der Probe als Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Genexpressionsanalyse wurde sowohl mit Markern für die Basallamina (Kollagen IV, Laminin 1 und 5) als auch mit Markern, die für die weitere Differenzierung typisch sind (Keratin K13 und K14) durchgeführt. Zum Vergleich der Mono- und Kokulturen wurde wie bei der RNA-Konzentrationsbestimmung die Summe der Ratios der beiden Monokulturen F 21 und K 14 („Summe F 21 & K 14“) gebildet, da diese der Kokultur F 21 + K 14 in Zelltyp und Kultivierungszeit entsprechen.

3.4.1 Deskriptive Statistik

Bei der Expression von Kollagen IV zeigte sich sowohl auf DRT als auch auf TFE bei den Kokulturen eine Steigerung der Expression im Laufe der Kultivierungszeit. Die Werte waren auf beiden Scaffolds bei den Kulturen F 21 + K 14 höher als bei F 14 + K 7. Bei der Kultur F 21 + K 14 auf TFE war die Ausschüttung am höchsten. Die Werte von F 21 + K 14 auf TFE wiesen große Schwankungen auf (Wertebereich: 0,63 bis 3,2), welche sich in einer großen Streuung der Werte insgesamt ($M = 1,69$, $SD = 1,1$) im Vergleich zu F 21 + K 14 auf DRT ($M = 0,76$, $SD = 0,24$) zeigten. Auf den Einzelkulturen war die Genexpression sowohl allein als auch in der Summe geringer als bei den Kokulturen (Abbildung 14).

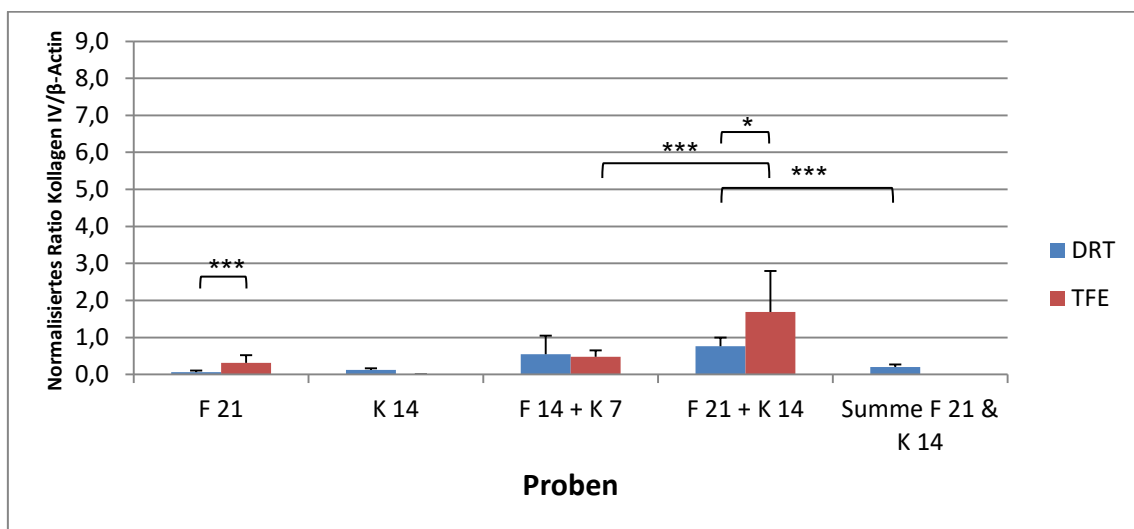


Abbildung 14: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Kollagen IV auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$)

Die Expression von Laminin 1 zeigte auf den Kokulturen ein ähnliches Expressionsmuster wie Kollagen IV. Auf DRT hatten die Kokulturen sogar für Kollagen IV und Laminin 1 nahezu die gleichen Werte. Auch hier war eine Steigerung der Expression auf beiden Scaffolds bei den Kokulturen von F 14 + K 7 auf F 21 + K 14 erkennbar. Die höchsten Werte zeigte die Monokultur der Fibroblasten F 21. Diese waren auch höher als die Werte der

beiden Kokulturen und damit auch die Summe der Monokulturen im Vergleich zu den Kokulturen. Insgesamt war die Genausschüttung von Laminin 1 auf DRT höher als auf TFE (Abbildung 15).

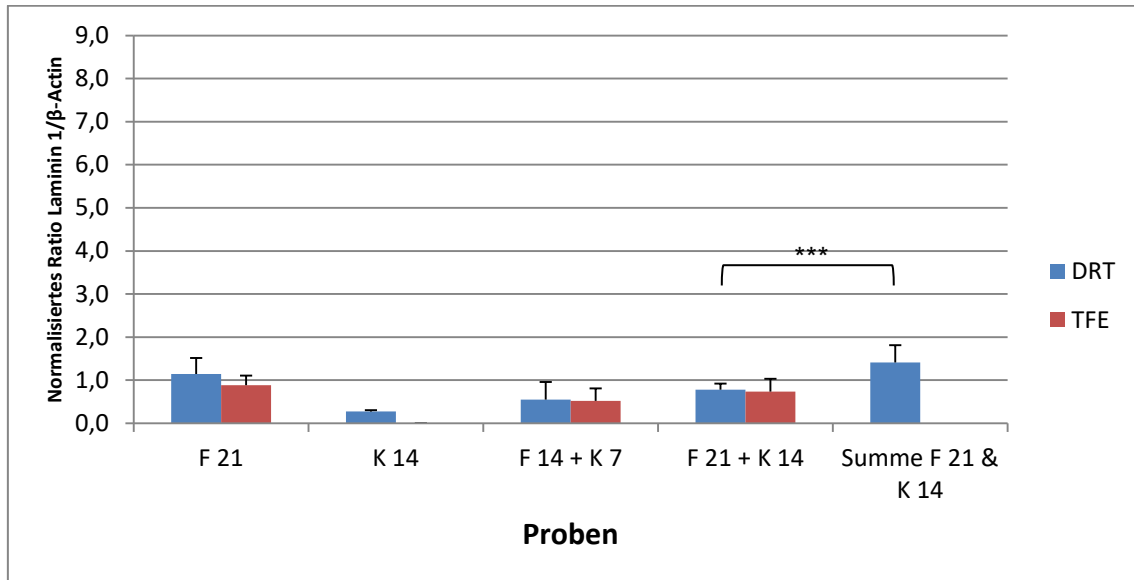


Abbildung 15: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Laminin 1 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$)

Ein gegenteiliges Expressionsmuster zeigte Laminin 5 auf den Kokulturen beider Scaffolds. Die Kulturen F 21 + K 14 zeigten eine geringere Ausschüttung im Vergleich zu den kürzer kultivierten Zellen F 14 + K 7. Während F 14 + K 7 auf TFE im Vergleich zu DRT noch einen höheren Wert zeigte, war dies bei F 21 + K 14 genau umgekehrt, sodass der Wert bei DRT höher war. Auch hier zeigte sich wieder eine große Streuung der Werte ($M = 1,36$, $SD = 1,34$ und $M = 0,4$, $SD = 0,38$) auf TFE. Die größte Expression von Laminin 5 war auf den Monokulturen der Keratinozyten K 14 auf DRT zu finden, die auch höher war als die auf den Kokulturen, während die Monokultur der Fibroblasten keine Genausschüttung zeigte (Abbildung 16).

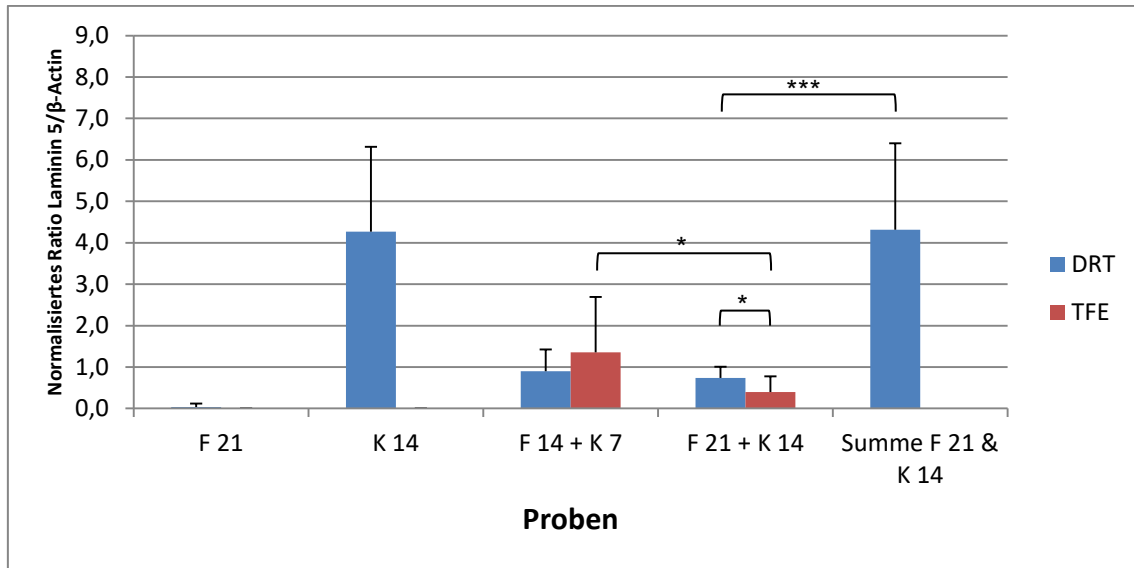


Abbildung 16: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Laminin 5 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$)

Keratin K14 zeigte ein nahezu identisches Genexpressionsmuster wie Laminin 5. Auch hier war eine Abnahme der Ausschüttung nach längerer Kulturzeit bei den Kokulturen zu beobachten (Differenz auf DRT von 0,3 und auf TFE von 0,85). Damit war die Abnahme der Werte ähnlich wie bei Laminin 5 auf TFE von F 14 + K 7 zu F 21 + K 14 größer als bei DRT. Die größten Werte zeigte die Monokultur der Keratinozyten auf DRT ($M = 1,91$). Die Fibroblasten schütteten keine messbare Mengen an Keratin K14 aus (Abbildung 17).

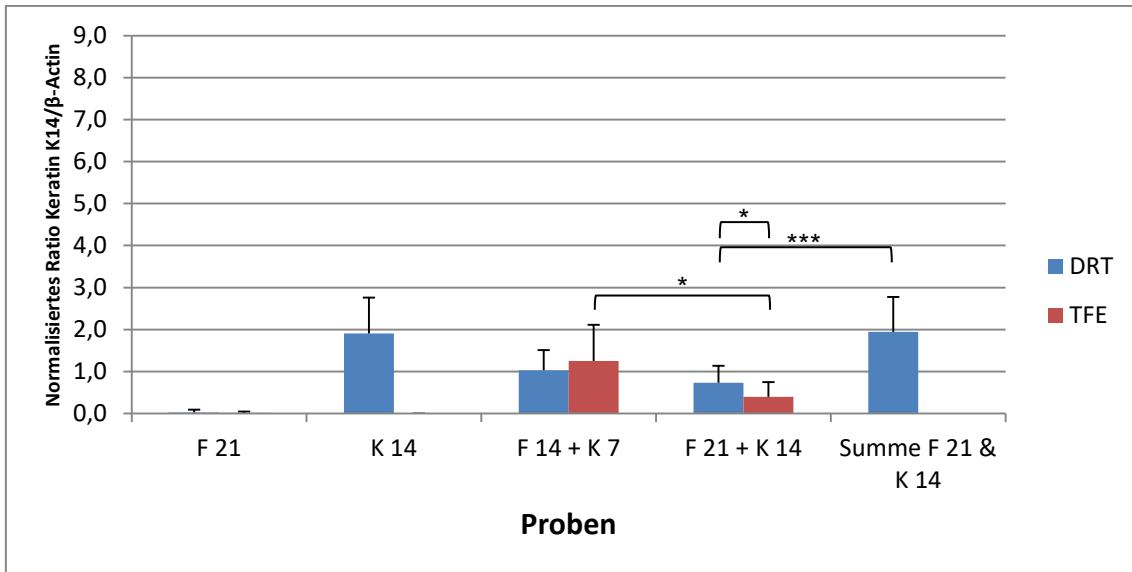


Abbildung 17: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Keratin K14 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$)

Auch bei Keratin K13 konnte eine Abnahme der Genausschüttung im Verlauf der Kulturzeit auf den Kokulturen beobachtet werden. Hier zeigten sowohl F 14 + K 7 als auch F 21 + K 14 auf TFE im Vergleich zu DRT eine größere Expression. Die Fibroblasten exprimierten kein Keratin K13, während die Monokultur der Keratinozyten auf DRT einen höheren Wert zeigte als die Kokulturen F 14 + K 7 und F 21 + K 14 auf DRT (Abbildung 18).

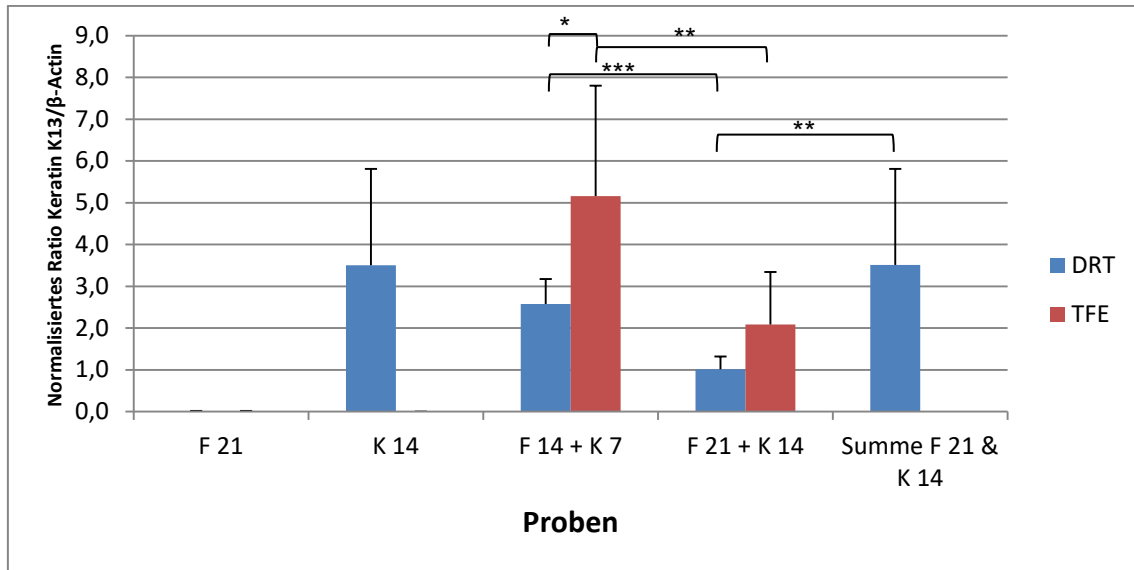


Abbildung 18: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Keratin K13 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$)

Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der einzelnen Gene für die zwei Scaffolds (DRT und TFE) und die unterschiedlichen Kultivierungsmethoden nochmals tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 8 und Tabelle 9).

Tabelle 8: Mittelwerte der normalisierten Ratios auf DRT. *M* = arithmetisches Mittel, *Md* = Median, *n* = Probenanzahl

	F 21			K 14			F 14 + K 7			F 21 + K 14			Summe F 21 & K 14		
	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>
Kollagen IV	0,07	0,05	5	0,13	0,13	4	0,55	0,47	4	0,76	0,64	5	0,20	0,19	4
Keratin K13	0,00	0,00	5	3,50	3,64	4	2,57	2,58	4	1,01	1,05	5	3,50	3,65	4
Laminin 1	1,15	1,16	5	0,27	0,27	4	0,55	0,60	4	0,78	0,75	5	1,42	1,40	4
Keratin K14	0,03	0,00	5	1,91	1,75	4	1,03	1,09	4	0,74	0,60	5	1,95	1,82	4
Laminin 5	0,04	0,00	5	4,27	4,06	4	0,90	0,80	4	0,74	0,80	5	4,32	4,15	4

Tabelle 9: Mittelwerte der normalisierten Ratios auf TFE. *M* = arithmetisches Mittel, *Md* = Median, *n* = Probenanzahl

	F 21			F 14 + K 7			F 21 + K 14		
	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>Md</i>	<i>n</i>
Kollagen IV	0,31	0,18	5	0,48	0,53	5	1,69	1,20	5
Keratin K13	0,00	0,00	5	5,16	5,42	5	2,08	2,25	5
Laminin 1	0,89	0,85	5	0,52	0,48	5	0,74	0,76	5
Keratin K14	0,01	0,00	5	1,25	1,09	5	0,40	0,25	5
Laminin 5	0,00	0,00	5	1,36	1,09	5	0,40	0,29	5

3.4.2 Induktive Statistik

Um die Mittelwerte der normalisierten Ratios (kontinuierliche Variable) zwischen zwei unabhängigen Gruppen (z. B. den Scaffolds DRT und TFE sowie den Kultivierungsmethoden) zu vergleichen, wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt, da nach vorangegangener Testung aller Ratios auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) diese Annahme nicht erfüllt ist (alle $p < 0,05$).

Dieser Test stellt die nicht parametrische Alternative zum unabhängigen t -Test dar und vergleicht statt der arithmetischen Mittel die Mediane der Gruppen.

Aufgrund der geringen Probenzahl und des explorativen Charakters dieser Untersuchung wird ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,2$ für alle nachfolgenden Analysen festgelegt.

Es wurden sowohl Mittelwertsvergleiche innerhalb der Scaffolds DRT und TFE als auch zwischen den beiden Scaffolds durchgeführt. Der Wert r gibt dabei die Effektgröße nach Cohen (1992) an, welche ein Maß für die Stärke des Unterschieds zwischen zwei Gruppen ist (hier: Scaffold und Kultivierungsmethode). Sie ist nach Cohen (Cohen 1992) folgendermaßen definiert: $0,1 < r < 0,3$ kleiner Effekt, $0,3 < r \leq 0,5$ mittlerer Effekt und $r > 0,5$ großer Effekt. Folgende Mittelwertsvergleiche wurden durchgeführt:

Tabelle 10: Mittelwertsvergleiche der normalisierten Ratios innerhalb der Scaffolds DRT und TFE. r = Effektgröße, p = Signifikanzwert

	DRT				TFE	
	F 14 + K 7 vs. F 21 + K 14		Summe F 21 & K 14 vs. F 21 + K 14		F 14 + K 7 vs. F 21 + K 14	
	p	r	p	r	p	r
Kollagen IV	0,33	0,33	0,01	0,82	0,01	0,83
Keratin K13	0,01	0,82	0,09	0,57	0,08	0,56
Laminin 1	0,39	0,29	0,03	0,73	0,21	0,40
Keratin K14	0,46	0,25	0,05	0,65	0,12	0,50
Laminin 5	0,81	0,08	0,04	1,14	0,17	0,43

Tabelle 11: Mittelwertvergleiche der normalisierten Ratios von DRT und TFE. Bei „-“ kein Vergleich möglich, da beide Mittelwerte = 0. r = Effektgröße, p = Signifikanzwert

	DRT vs. TFE					
	F 21		F 14 + K 7		F 21 + K 14	
	p	r	p	r	p	r
Kollagen IV	0,01	0,83	0,54	0,20	0,12	0,50
Keratin K13	-	-	0,14	0,49	0,25	0,36
Laminin 1	0,21	0,40	1,00	0,00	0,92	0,03
Keratin K14	-	-	0,81	0,08	0,17	0,43
Laminin 5	-	-	0,81	0,08	0,17	0,43

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte bei DRT einen großen signifikanten Unterschied in den normalisierten Ratios von Keratin K13 bei „F 14 + K 7“ ($Md = 2,58$, $n = 4$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 1,05$, $n = 5$), $U = 0$, $z = -2,449$, $p = 0,014$, $r = 0,82$.

Beim Vergleich der Summen der Monokulturen „Summe F 21 & K 14“ und der Kokulturen „F 21 + K 14“ von DRT zeigte sich bei allen Genen ein großer signifikanter Unterschied (alle $p < 0,086$ und alle $r > 0,57$). Die Unterschiede stellten sich folgendermaßen dar:

Unterschied in den normalisierten Ratios von Kollagen IV von „Summe F 21 & K 14“ ($Md = 0,185$, $n = 4$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 0,64$, $n = 5$), $U = 0$, $z = -2,449$, $p = 0,014$, $r = 0,82$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Keratin K13 von „Summe F 21 & K 14“ ($Md = 3,645$, $n = 4$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 1,05$, $n = 5$), $U = 3$, $z = -1,715$, $p = 0,086$, $r = 0,57$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Laminin 1 von „Summe F 21 & K 14“ ($Md = 1,4$, $n = 4$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 0,75$, $n = 5$), $U = 1$, $z = -2,205$, $p = 0,027$, $r = 0,73$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Keratin K14 von „Summe F 21 & K 14“ ($Md = 1,82$, $n = 4$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 0,6$, $n = 5$), $U = 2$, $z = -1,960$, $p = 0,050$, $r = 0,65$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Laminin 5 von „Summe F 21 & K 14“ ($Md = 4,15$, $n = 4$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 0,8$, $n = 5$), $U = 0$, $z = -3,411$, $p = 0,040$, $r = 1,14$.

Auf TFE zeigte der Mann-Whitney-U-Test einen großen signifikanten Unterschied bei Kollagen IV und den Keratinen K13 und K14 bei den Kokulturen im Laufe der Kultivierungszeit. Bei der Laminin 5 Expression war lediglich ein mittlerer signifikanter Unterschied zu beobachten. Es zeigten sich folgende Unterschiede in den normalisierten Ratios:

Unterschied in den normalisierten Ratios von Kollagen IV von „F 14 + K 7“ ($Md = 0,53$, $n = 5$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 1,20$, $n = 5$), $U = 0$, $z = -2,611$, $p = 0,009$, $r = 0,83$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Keratin K13 von „F 14 + K 7“ ($Md = 5,42$, $n = 5$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 2,25$, $n = 5$), $U = 4$, $z = -1,776$, $p = 0,076$, $r = 0,56$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Keratin K14 von „F 14 + K 7“ ($Md = 1,09$, $n = 5$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 0,25$, $n = 5$), $U = 5$, $z = -1,571$, $p = 0,116$, $r = 0,50$.

Mittlerer signifikanter Unterschied in den normalisierten Ratios von Laminin 5 von „F 14 + K 7“ ($Md = 1,09$, $n = 5$) und „F 21 + K 14“ ($Md = 0,29$, $n = 5$), $U = 6$, $z = -1,362$, $p = 0,173$, $r = 0,43$.

Beim Vergleich der Scaffolds DRT und TFE ergab der Mann-Whitney-U-Test einen großen signifikanten Unterschied in den normalisierten Ratios von Kollagen IV von TFE „F21“ ($Md = 0,18$, $n = 5$) und DRT „F 21“ ($Md = 0,05$, $n = 5$), $U = 0$, $z = -2,619$, $p = 0,009$, $r = 0,83$ und einen mittleren signifikanten Unterschied in den normalisierten Ratios von Keratin K13 von TFE „F14 + K 7“ ($Md = 5,42$, $n = 5$) und DRT „F14 + K 7“ ($Md = 2,58$, $n = 4$), $U = 4$, $z = -1,470$, $p = 0,142$, $r = 0,49$.

Bei den Vergleichen der Kokulturen F 21 + K 14 der Scaffolds TFE und DRT wiesen die Gene Kollagen IV, Keratin K14 und Laminin 5 mittlere signifikante Unterschiede auf. Diese stellten sich wie folgt dar:

Unterschied in den normalisierten Ratios von Kollagen IV von TFE „F 21 + K 14“ ($Md = 1,2$, $n = 5$) und DRT „F 21 + K 14“ ($Md = 0,64$, $n = 5$), $U = 5$, $z = -1,567$, $p = 0,117$, $r = 0,50$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Keratin K14 von TFE „F 21 + K 14“ ($Md = 0,25$, $n = 5$) und DRT „F 21 + K 14“ ($Md = 0,6$, $n = 5$), $U = 6$, $z = -1,362$, $p = 0,173$, $r = 0,43$.

Unterschied in den normalisierten Ratios von Laminin 5 von TFE „F 21 + K 14“ ($Md = 0,29$, $n = 5$) und DRT „F 21 + K 14“ ($Md = 0,8$, $n = 5$), $U = 6$, $z = -1,362$, $p = 0,173$, $r = 0,43$.

Die signifikanten Mittelwertsvergleiche wurden nochmal in einer Tabelle zusammengefasst (Tabelle 12).

Tabelle 12: Signifikante Mittelwertsvergleiche ($p \leq 0,2$) der verschiedenen Kulturmethode auf DRT und TFE für die untersuchten Gene (Kollagen IV, Laminin 1 und 5, Keratin K13 und K14). Md = Median, n = Probenanzahl, U = U-Wert (Mann-Whitney-U-Test), z = z-Wert, p = Signifikanzwert, r = Effektgröße

Kulturmethode	Md	n	Kulturmethode	Md	n	Gen	U	z	p	r
DRT „F 14 + K 7“	2,58	4	DRT „F 21 + K 14“	1,05	5	Keratin K 13	0	-2,449	0,014	0,82
DRT „Summe F 21 & K 14“	0,19	4	DRT „F 21 + K 14“	0,64	5	Kollagen IV	0	-2,449	0,014	0,82
DRT „Summe F 21 & K 14“	3,65	4	DRT „F 21 + K 14“	1,05	5	Keratin K13	3	-1,715	0,086	0,57
DRT „Summe F 21 & K 14“	1,40	4	DRT „F 21 + K 14“	0,75	5	Laminin 1	1	-2,205	0,027	0,73
DRT „Summe F 21 & K 14“	1,82	4	DRT „F 21 + K 14“	0,60	5	Keratin K 14	2	-1,960	0,050	0,65
DRT „Summe F 21 & K 14“	4,15	4	DRT „F 21 + K 14“	0,80	5	Laminin 5	0	-3,411	0,040	1,14
TFE „F 14 + K 7“	0,53	5	TFE „F 21 + K 14“	1,20	5	Kollagen IV	0	-2,611	0,009	0,83
TFE „F 14 + K 7“	5,42	5	TFE „F 21 + K 14“	2,25	5	Keratin K13	4	-1,776	0,076	0,56
TFE „F 14 + K 7“	1,09	5	TFE „F 21 + K 14“	0,25	5	Keratin K 14	5	-1,571	0,116	0,50
TFE „F 14 + K 7“	1,09	5	TFE „F 21 + K 14“	0,29	5	Laminin 5	6	-1,362	0,173	0,43
TFE „F 21“	0,18	5	DRT „F 21“	0,05	5	Kollagen IV	0	-2,619	0,009	0,83
TFE „F 14 + K 7“	5,42	5	DRT „F 14 + K 7“	2,58	4	Keratin K13	4	-1,470	0,142	0,49
TFE „F 21 + K 14“	1,20	5	DRT „F 21 + K 14“	0,64	5	Kollagen IV	5	-1,567	0,117	0,50
TFE „F 21 + K 14“	0,25	5	DRT „F 21 + K 14“	0,60	5	Keratin K14	6	-1,362	0,173	0,43
TFE „F 21 + K 14“	0,29	5	DRT „F 21 + K 14“	0,80	5	Laminin 5	6	-1,362	0,173	0,43

4. Diskussion

Die uneingeschränkte Integrität der Mundschleimhaut stellt die Grundlage für Atmung, Sprachgestaltung, Nahrungsaufnahme und Kaufunktion dar. Wenn diese durch Traumata, erworbene oder angeborene Krankheiten beeinträchtigt ist, bedeutet dies häufig eine große Einschränkung der Lebensqualität. Ziel der Medizin ist es, diese Defekte adäquat zu versorgen. Dabei stellt allerdings das begrenzte Angebot an autologem Spendergewebe häufig ein großes Problem dar. Deshalb wird versucht, mittels Tissue Engineering, also der gezielten Züchtung von Gewebe, aus autologen Zellen ein Gewebe zu entwickeln, das diese Defekte verschließen kann und dabei keine Fremdkörperreaktion hervorruft. Dabei ist es wichtig, dass die Trägermaterialien im Laufe der Zeit vom Körper resorbiert werden. Für ein funktionierendes Transplantat spielt nicht nur die Zellteilung und damit die Vermehrung der Zellen eine Rolle, sondern es ist auch wichtig, dass eine Differenzierung stattfindet und damit eine Reifung der Zellen. Außerdem stellt die Ausbildung einer Basalmembran zwischen Fibroblasten und Keratinozyten einen wichtigen Faktor für die Funktion eines Mundschleimhauttransplantats dar. Zur Überprüfung der Differenzierung und der Ausbildung einer Basalmembran können diese Transplantate mittels PCR auf die Genausschüttung von molekularen Markern für die Differenzierung und die Basalmembran untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Fibroblasten und Keratinozyten auf den zwei unterschiedlichen Scaffolds DRT und TFE auf Kollagen IV, Laminin 1 und 5 als Marker für die Basalmembran und Keratin K13 und K14 als Marker für die Differenzierung untersucht. Die Untersuchung erfolgte mittels relativer Quantifizierung, was zuvor die Auswahl eines Referenzgens nötig machte. Zusätzlich wurde die Quantifizierung effizienzkorrigiert und auf einen Kalibrator normalisiert durchgeführt, da so aussagekräftige Werte erzielt werden können und die einzelnen Werte miteinander vergleichbar sind.

4.1 Auswahl des Referenzgens

Die Suche nach geeigneten Referenzgenen ist eine kontinuierlich geführte Fragestellung (Campos, Rodini et al. 2009). β -Actin (ACTB) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gehören zu den am häufigsten verwendeten Referenzgenen (Barber, Harmer et al. 2005; Campos, Rodini et al. 2009). Sie werden auch bei der relativen Quantifizierung im Bereich der Erforschung des oralen Plattenepithelkarzinoms (Hirano, Nagata et al. 2009), sowie zur Quantifizierung bei Untersuchungen der Wundheilung nach Weisheitszahnentfernung verwendet (Warburton, Nares et al. 2005). Allerdings zeigen auch diese Gene immer wieder Schwankungen in der Genausschüttung die durch Medikamente oder andere Faktoren wie stimulierende Behandlungen der Zellen ausgelöst werden können (de Kok, Roelofs et al. 2005; Campos, Rodini et al. 2009). Deshalb ist es wichtig für jedes einzelne Experiment erneut zu prüfen, welches Referenzgen geeignet ist (Bustin, Benes et al. 2005). Es gibt keine einheitliche Methode die geeigneten Gene zu finden, allerdings stehen mit NormFinder, BestKeeper und GeNorm mittlerweile auch computergestützte Programme zur Verfügung, die bei der Auswahl behilflich sind (Thellin, ElMoualij et al. 2009; Taihi, Nassif et al. 2016). Bei dem vorliegenden Experiment wurde das Referenzgen durch die Interpretation der Verhältnismuster der unterschiedlich kultivierten Proben bestimmt. Dabei zeigte sich, dass GAPDH bei den Kokulturen eine erhöhte Ausschüttung zeigte, während ACTB und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) wesentlich konstanter exprimiert wurden. Dies lässt sich möglicherweise durch den erhöhten Zellumsatz und den damit verbundenen erhöhten Energiebedarf bei den Kokulturen erklären, da GAPDH eines der Enzyme ist, das für den Reaktionsweg der Glykolyse zuständig ist (Barber, Harmer et al. 2005), während G6PD ein Enzym des Pentosephosphatwegs ist und damit nicht direkt der Energiegewinnung dient (Nelson, Lehninger et al. 2008).

Die Quantifizierung der Proben ließe sich durch eine computergestützte Auswahl des Referenzgens mittels der genannten Programme, sowie durch eine größere Anzahl an Referenzgenen im Sinne eines Referenzgenindex

noch verfeinern. Diese Verfeinerungen wären allerdings auch mit einem erhöhten experimentellen Aufwand verbunden, der den Rahmen der vorliegenden Arbeit übersteigt.

4.2 Einstellen der Primerbedingungen

Die Empfindlichkeit und damit Genauigkeit einer PCR ist von ihrer Effizienz abhängig. Deshalb sollte eine möglichst hohe PCR-Effizienz erzielt werden (Wilhelm and Pingoud 2003). Sie kann mittels einer Standardverdünnungsreihe über die Steigung der C_t -Werte mit der Formel $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ berechnet werden (Pfaffl 2001). Diese Methode ist allerdings fehleranfällig und führt häufig dazu, dass die PCR-Effizienz überschätzt wird, da auch Werte von $E > 2,0$ entstehen können, die theoretisch nicht möglich sind (Pfaffl 2004). Allerdings kann diese Berechnung als Anhaltspunkt für eine Optimierung der PCR-Bedingungen dienen, die unter anderem von den Primerbedingungen abhängig sind, die im Rahmen dieser Arbeit eingestellt wurden. Für die später durchgeführten Experimente zur Untersuchung der Proben wurden mittels der Relative Quantification Software 1.0 individuelle PCR-Effizienzen für die einzelnen Gene und Verdünnungsbereiche verwendet um eine möglichst genaue Quantifizierung zu erreichen.

Bei der Einstellung der Primerbedingungen wurde ähnlich wie bei Henegariu et al. (Henegariu, Heerema et al. 1997) vorgegangen, allerdings wurden ausschließlich die Temperaturen und Haltezeiten beim Annealing und während der Extensionsphase verändert, nicht wie bei der Multiplex-PCR auch Primer- und Puffer-Konzentration. Diese Einstellungen reichten aber aus um für jedes einzelne Gen eine durchschnittliche PCR-Effizienz von $E > 1,9$ zu erreichen, welche als mehr als ausreichend gilt (Pfaffl 2004).

4.3 Genexpressionsanalyse mittels Real-time PCR

Zur Untersuchung der Genausschüttung wurden die Keratinozyten- und Fibroblasten-Monokulturen, sowie die Kokulturen mittels einer quantitativen Real-time PCR untersucht. Diese wurde effizienzkorrigiert und auf einen

Kalibrator normalisiert durchgeführt. Als Referenzgen diente β -Actin, welches zuvor auf seine konstante Expression untersucht wurde. Es sollte zum einen untersucht werden wie sich eine verlängerte Kulturzeit der Kokulturen auf die Ausbildung der Basalmembran und die Differenzierung und damit auf die Genexpression auswirkt und zum anderen, wie sich die Monokulturen in ihrer Genexpression zu den Kokulturen unterscheiden und welche Gene von welcher Zellart exprimiert werden. Dabei entspricht die Summe der Monokulturen F 21 und K 14 in Zelltyp und Kultivierungszeit der Kokultur F 21 + K 14 und wurde als Vergleich herangezogen.

Die Untersuchung wurde für die Gene Kollagen IV sowie die Laminine 1 und 5 durchgeführt, welche häufig als Marker für die Basalmembran eingesetzt werden (Rakhorst, Posthumus-Van Sluijs et al. 2006; Pena, Junquera et al. 2010; Golinski, Groger et al. 2011; Tra, van Neck et al. 2012). Kollagen IV und Laminin 1 sind Teil der Trägernetze der Basallamina, während Laminin 5 als kreuzförmiges Ankerfilament für die Haftung der Keratinozyten über die Transmembranproteine an der Basallamina verantwortlich ist (Borradori and Sonnenberg 1999). Des Weiteren wurden die Genexpressionanalyse für die Differenzierungsmarker Keratin K13 und K14 durchgeführt, welche seit Jahren unter anderem in histologische Untersuchungen verwendet werden (El Ghalbzouri, Jonkman et al. 2005; Pena, Junquera et al. 2010). Während Keratin K14 im Stratum basale zusammen mit Keratin K5 ein Teil des Zytoskeletts der Keratinozyten darstellt und vor allem in stark proliferierenden Schichten exprimiert wird, gehört Keratin K13 zusammen mit Keratin K4 zu den Markern der suprabasalen Zellschichten, in welchen die Keratine K14 und K5 in ihrer Genexpression herunterregelt werden (Presland and Dale 2000; Garant 2003).

Die Scaffolds DRT und TFE zeigten beide bei einer verlängerten Kulturzeit eine gesteigerte Expression von Kollagen IV und Laminin 1, was für eine verbesserte Ausbildung der Basalmembran im Laufe der Zeit spricht. Die Steigerung der Expression von Kollagen IV bei TFE im Vergleich von F14 + K 7 und F 21 + K 14 war am höchsten und auch in der statistischen Auswertung signifikant. Die Monokulturen der Fibroblasten und Keratinozyten exprimierten

nahezu kein Kollagen IV. Der signifikante Unterschied lässt auf eine Wechselwirkung der beiden Zelltypen schließen, welche zu einer gesteigerten Expression von Kollagen IV führt. Bei Laminin 1 hingegen war die Genexpression in Summe auf den Monokulturen signifikant am höchsten, wobei die Fibroblasten Monokulturen auf beiden Scaffolds die größten Werte aufwiesen, was auf einen inhibierenden Effekt der Keratinozyten auf die Fibroblasten schließen lässt.

Die Laminin 5 Expression zeigte im Gegensatz zu Kollagen IV und Laminin 1 auf den Kokulturen im Laufe der Zeit abnehmende Werte. Während bei den F 14 + K 7 Kulturen TFE noch eine nicht signifikant höhere Expression im Vergleich zu DRT zeigte, war diese bei F 21 + K 14 auf DRT signifikant höher. Die abnehmende Genexpression bei den länger kultivierten Zellen spricht dafür, dass der Verbund von Basalmembran und Keratinozyten über Laminin 5 bereits nach 7 Tagen weitestgehend abgeschlossen sein muss. Die Monokulturen der Keratinozyten zeigten die signifikant höchste Laminin 5 Expression, die bei den Kokulturen durch die Fibroblasten offensichtlich stark inhibiert wird. Die Fibroblasten zeigten keine Laminin 5 Expression.

Dass Laminin 5 von Keratinozyten exprimiert wird und auch die Expression von Kollagen IV und Laminin 1 der Wechselwirkung von Fibroblasten und Keratinozyten unterliegt, deckt sich mit den Erkenntnissen, die bereits für Zellkulturen mit Hautzellen gewonnen wurden (Smola, Stark et al. 1998; El Ghalbzouri, Jonkman et al. 2005).

Bei den Differenzierungsmarkern Keratin K13 und K14 zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster. Sowohl die Expression von Keratin K13 als auch K14 nahm über die Kultivierungszeit bei den Kokulturen ab, allerdings waren nur die Unterschiede bei Keratin K13 auf beiden Scaffolds und bei Keratin K14 auf TFE signifikant. Da Keratin K13 vor allem in suprabasalen Zellen exprimiert wird, hätte man eher einen Anstieg im Laufe der Zeit erwartet, während die Abnahme der Expression von Keratin K14 sich mit den Erwartungen der veränderten Genexpression im Laufe der Differenzierung deckt. Allerdings zeigten auch andere Untersuchungen an Oral-Mukosa-Äquivalenten, dass Keratin K13, im Vergleich zur natürlichen oralen Mukosa, leicht veränderte Expressionsmuster

zeigen kann und teilweise auch schon in basalen Zellschichten exprimiert wird (Terada, Izumi et al. 2012). Außerdem wurde, zumindest bei Untersuchungen der Epithelien von menschlichen Stimmfalten, eine wesentliche Überlappung in der Expression bei den Keratinen K13 und K14 über die typischen Zellschichten hinaus festgestellt (Dowdall, Sadow et al. 2015). Diese Erkenntnisse könnten die unerwartete Abnahme der Expression von Keratin K13 erklären. Die beiden Keratine K13 und K14 wurden wie erwartet ausschließlich von den Keratinozyten exprimiert (Fuchs and Green 1978), deren Monokulturen auch die signifikant höchsten Werte zeigten. Auch bei den Differenzierungsmarkern zeigen die Kokulturen mit den Fibroblasten eine Wechselwirkung mit inhibierendem Effekt auf die Genexpression der Keratinozyten.

Zur besseren Bewertung der Differenzierung wäre eine Untersuchung auf weitere Differenzierungsmarker wie Involucrin oder Filaggrin möglich, da diese erst in höher differenzierten mehrschichtigen Plattenepithelien der oralen Mukosa exprimiert werden (Presland and Dale 2000).

Abschließend lässt sich über die molekularbiologische Untersuchung sagen, dass TFE zwar eine signifikant höhere Genexpression von Keratin K13 bei den F 14 + K 7 Kokulturen und von Kollagen IV bei den F 21 + K 14 Kokulturen aufwies, allerdings DRT bei den Verlaufskontrollen der Kokulturen F 21 + K 14 eine stabilere Genexpression mit signifikanten Unterschieden bei Keratin K14 und Laminin 5 mit insgesamt weniger Schwankungen und Ausreißern zeigte. Schon bei der Bestimmung der RNA-Konzentration waren bei DRT höhere Werte vorhanden, die sich allerdings nicht in allen Genexpressionsmustern wiederfinden ließ. Insgesamt zeigt DRT aus molekularbiologischer Sicht der quantitativen PCR-Untersuchung ein größeres Potenzial dafür, sodass sich dieses Scaffold für eine mögliche klinische Anwendung eignen könnte.

5. Zusammenfassung

Die Deckung von Gewebedefekten mittels von im Tissue-Engineering-Verfahren hergestellten Transplantaten stellt aufgrund des begrenzten Angebots an autologem Spendergewebe eine gute Möglichkeit dar, angeborene oder erworbene Defekte zu versorgen. Allerdings stellt die Wahl der Zellträger oder Scaffolds für die Wissenschaft immer eine Herausforderung dar, da diese sowohl vom Körper resorbierbar und für die Zellen gut penetrierbar sein sollten, als aber auch stabil in der Handhabung bei der Zellkultur und in der chirurgischen Applikation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fibroblasten und Keratinozyten, welche *in vitro* auf den beiden Scaffolds DRT und TFE sowohl gemeinsam als auch in Monokulturen gezüchtet wurden, mittels Real-time PCR auf ihre Genausschüttung untersucht, um festzustellen wie sich die Unterlage auf die Genausschüttung auswirkt. Hierzu wurden die Proben sowohl auf die Genexpressionsmarker für die Basallamina Kollagen IV, Laminin 1 und 5 als auch auf die Genexpressionsmarker für die frühe Differenzierung Keratin K13 und K14 untersucht.

Die Untersuchung erfolgte mittels einer relativen, effizienzkorrigierten, auf einen Kalibrator normalisierten Quantifizierung. Dabei ist es wichtig zuerst ein geeignetes Referenzgen zu finden und dann die PCR-Bedingungen so zu optimieren, dass eine möglichst hohe Effizienz erzielt wird, da nur so aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden können.

Als Referenzgen wurde β -Actin ausgewählt, da dieses Gen in den Vorversuchen mit zwei weiteren möglichen Referenzgenen die stabilste Expression gezeigt hatte. Die PCR-Effizienzen für die Referenz- und Zielgene wurde ebenfalls in den Vorversuchen optimiert, sodass eine Effizienz von $E > 1,9$ erzielt werden konnte.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass nur in den Kokulturen von Keratinozyten und Fibroblasten eine ausgewogene Genexpression stattfindet, da sich die Zellen darin beeinflussen und regulieren. Bei den beiden Scaffolds zeigte zwar TFE in den Kokulturen teilweise signifikant höhere

Genexpressionen gegenüber DRT, allerdings war DRT in seiner Genausschüttung insgesamt stabiler und gleichmäßiger. Daher würde sich DRT besser für einen möglichen klinischen Einsatz eignen.

6. Literaturverzeichnis

- Alsberg, E., E. E. Hill, et al. (2001). "Craniofacial tissue engineering." Crit Rev Oral Biol Med **12**(1): 64-75.
- Alvarez, M. L. and S. C. Done (2014). "SYBR(R) Green and TaqMan(R) quantitative PCR arrays: expression profile of genes relevant to a pathway or a disease state." Methods Mol Biol **1182**: 321-359.
- Andrian, E., D. Grenier, et al. (2004). "In vitro models of tissue penetration and destruction by Porphyromonas gingivalis." Infect Immun **72**(8): 4689-4698.
- Barber, R. D., D. W. Harmer, et al. (2005). "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues." Physiol Genomics **21**(3): 389-395.
- Barth, J., G. Richter, et al. (1991). Dermatologie. Leipzig; Heidelberg, Barth.
- Bhargava, S., J. M. Patterson, et al. (2008). "Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty-clinical outcomes." Eur Urol **53**(6): 1263-1269.
- Black, A. F., C. Bouez, et al. (2005). "Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent." Tissue Eng **11**(5-6): 723-733.
- Bonasera, V., S. Alberti, et al. (2007). "Protocol for high-sensitivity/long linear-range spectrofluorimetric DNA quantification using ethidium bromide." Biotechniques **43**(2): 173-174, 176.
- Borradori, L. and A. Sonnenberg (1999). "Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." J Invest Dermatol **112**(4): 411-418.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." J Mol Endocrinol **34**(3): 597-601.
- Campos, M. S., C. O. Rodini, et al. (2009). "GAPD and tubulin are suitable internal controls for qPCR analysis of oral squamous cell carcinoma cell lines." Oral Oncol **45**(2): 121-126.
- Cho, K. H., H. T. Ahn, et al. (2000). "Reconstruction of human hard-palate mucosal epithelium on de-epidermized dermis." J Dermatol Sci **22**(2): 117-124.
- Cohen, J. (1992). "Statistical Power Analysis." Current Directions in Psychological Science **1**(3): 98-101.
- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, et al. (2005). "Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes." Lab Invest **85**(1): 154-159.
- Desjardins, P. and D. Conklin (2010). "NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids." J Vis Exp(45).
- Dowdall, J. R., P. M. Sadow, et al. (2015). "Identification of distinct layers within the stratified squamous epithelium of the adult human true vocal fold." Laryngoscope **125**(9): E313-319.
- Eckert, R. L., J. F. Crish, et al. (1997). "The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation." Physiol Rev **77**(2): 397-424.
- El Ghalbzouri, A., M. F. Jonkman, et al. (2005). "Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts

- and/or exogenously activated keratinocytes." J Invest Dermatol **124**(1): 79-86.
- Erlich, H. A. (1989). "Polymerase chain reaction." J Clin Immunol **9**(6): 437-447.
- Fuchs, E. (1990). "Epidermal differentiation: the bare essentials." J Cell Biol **111**(6 Pt 2): 2807-2814.
- Fuchs, E. and H. Green (1978). "The expression of keratin genes in epidermis and cultured epidermal cells." Cell **15**(3): 887-897.
- Fuchs, E. and H. Green (1980). "Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte." Cell **19**(4): 1033-1042.
- Garant, P. R. (2003). Oral cells and tissues. Chicago, Quintessence Pub. Co.
- Golinski, P. A., S. Groger, et al. (2011). "Oral mucosa model based on a collagen-elastin matrix." J Periodontal Res **46**(6): 704-711.
- Green, K. J. and J. C. Jones (1996). "Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components." FASEB J **10**(8): 871-881.
- Gursoy, U. K., M. Pollanen, et al. (2010). "Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of *Fusobacterium nucleatum* in an oral mucosa culture model." J Periodontol **81**(7): 1084-1091.
- Hauben, D. J., A. Baruchin, et al. (1982). "On the history of the free skin graft." Ann Plast Surg **9**(3): 242-245.
- Heid, C. A., J. Stevens, et al. (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-994.
- Henegariu, O., N. A. Heerema, et al. (1997). "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol." Biotechniques **23**(3): 504-511.
- Higuchi, R., G. Dollinger, et al. (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-417.
- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-1030.
- Hirano, C., M. Nagata, et al. (2009). "Tetraspanin gene expression levels as potential biomarkers for malignancy of gingival squamous cell carcinoma." Int J Cancer **124**(12): 2911-2916.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, et al. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7276-7280.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.
- Izumi, K., S. E. Feinberg, et al. (2003). "Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report." Int J Oral Maxillofac Surg **32**(2): 188-197.
- Izumi, K., G. Takacs, et al. (1999). "Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent." J Oral Maxillofac Surg **57**(5): 571-577; discussion 577-578.
- Kainz, P. (2000). "The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations." Biochim Biophys Acta **1494**(1-2): 23-27.

- Kaiser, H. W., G. B. Stark, et al. (1994). "Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique)." Burns **20**(1): 23-29.
- Kasper, C. (2005). "Ersatzteillager Mensch? Tissue Engineering." Chemie in unserer Zeit **39**(6): 394-401.
- Khan, M. A., S. N. Ali, et al. (2010). "Use of dermal regeneration template (Integra) for reconstruction of full-thickness complex oncologic scalp defects." J Craniofac Surg **21**(3): 905-909.
- Kim, J., S. W. Suh, et al. (2004). "Replacement of a tracheal defect with a tissue-engineered prosthesis: early results from animal experiments." J Thorac Cardiovasc Surg **128**(1): 124-129.
- Kleppe, K., E. Ohtsuka, et al. (1971). "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." J Mol Biol **56**(2): 341-361.
- Lauer, G. and R. Schimming (2001). "Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study." J Oral Maxillofac Surg **59**(2): 169-175; discussion 175-167.
- Lee, S. B., H. W. Jeon, et al. (2003). "Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-->3), (1-->6)-beta-glucan." Biomaterials **24**(14): 2503-2511.
- Luitaud, C., C. Laflamme, et al. (2007). "Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **83**(2): 554-561.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Madden, M. R., J. L. Finkelstein, et al. (1986). "Grafting of cultured allogeneic epidermis on second- and third-degree burn wounds on 26 patients." J Trauma **26**(11): 955-962.
- Mao, J. S., H. F. Liu, et al. (2003). "The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods." Biomaterials **24**(9): 1621-1629.
- Marsh, D., K. Suchak, et al. (2011). "Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients." J Pathol **223**(4): 470-481.
- Masuda, I. (1996). "[An in vitro oral mucosal model reconstructed from human normal gingival cells]." Kokubyo Gakkai Zasshi **63**(2): 334-353.
- Mohammadi, M., R. Mofid, et al. (2011). "Peri-implant soft tissue management through use of cultured gingival graft: a case report." Acta Med Iran **49**(5): 319-324.
- Mohammadi, M., M. A. Shokrgozar, et al. (2007). "Culture of human gingival fibroblasts on a biodegradable scaffold and evaluation of its effect on attached gingiva: a randomized, controlled pilot study." J Periodontol **78**(10): 1897-1903.
- Moharamzadeh, K., I. M. Brook, et al. (2007). "Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature." J Dent Res **86**(2): 115-124.
- Moharamzadeh, K., H. Colley, et al. (2012). "Tissue-engineered oral mucosa." J Dent Res **91**(7): 642-650.

- Moharamzadeh, K., K. L. Franklin, et al. (2009). "Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model." J Periodontol **80**(5): 769-775.
- Moriyama, T., I. Asahina, et al. (2001). "Development of composite cultured oral mucosa utilizing collagen sponge matrix and contracted collagen gel: a preliminary study for clinical applications." Tissue Eng **7**(4): 415-427.
- Mostefaoui, Y., I. Claveau, et al. (2004). "In vitro analyses of tissue structure and interleukin-1beta expression and production by human oral mucosa in response to *Candida albicans* infections." Cytokine **25**(4): 162-171.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Mullis, K. B. (1994). "The Polymerase Chain-Reaction (Nobel Lecture)." Angewandte Chemie-International Edition in English **33**(12): 1209-1213.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Nanci, A. (2007). Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. St. Louis, MO, Mosby, Inc., and affiliate of Elsevier Inc.
- Navarro, E., G. Serrano-Heras, et al. (2015). "Real-time PCR detection chemistry." Clin Chim Acta **439**: 231-250.
- Nelson, D. L., A. L. Lehninger, et al. (2008). Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman.
- Ng, K. W., H. L. Khor, et al. (2004). "In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts." Biomaterials **25**(14): 2807-2818.
- Ng, K. W., W. Tham, et al. (2005). "Assimilating cell sheets and hybrid scaffolds for dermal tissue engineering." J Biomed Mater Res A **75**(2): 425-438.
- Ojeh, N. O., J. D. Frame, et al. (2001). "In vitro characterization of an artificial dermal scaffold." Tissue Eng **7**(4): 457-472.
- Pena, I., L. M. Junquera, et al. (2010). "In vitro engineering of complete autologous oral mucosa equivalents: characterization of a novel scaffold." J Periodontal Res **45**(3): 375-380.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pfaffl, M. W. (2004). "Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung." BIOspektrum **10**(1): 92-95.
- Postollec, F., H. Falentin, et al. (2011). "Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology." Food Microbiol **28**(5): 848-861.
- Presland, R. B. and B. A. Dale (2000). "Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease." Crit Rev Oral Biol Med **11**(4): 383-408.
- Presland, R. B. and R. J. Jurevic (2002). "Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues." J Dent Educ **66**(4): 564-574.
- Rakhorst, H. A., S. J. Posthumus-Van Sluijs, et al. (2006). "Fibroblasts accelerate culturing of mucosal substitutes." Tissue Eng **12**(8): 2321-2331.

- Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, et al. (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Anal Biochem **245**(2): 154-160.
- Ruszymah, B. H. (2004). "Autologous human fibrin as the biomaterial for tissue engineering." Med J Malaysia **59 Suppl B**: 30-31.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.
- Scheller, E. L., P. H. Krebsbach, et al. (2009). "Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation." J Oral Rehabil **36**(5): 368-389.
- Schonleben, F., T. Reck, et al. (2006). "Collagen foil (TissuFoil E) reduces the formation of adhesions when using polypropylene mesh for the repair of experimental abdominal wall defects." Int J Colorectal Dis **21**(8): 840-846.
- Smola, H., H. J. Stark, et al. (1998). "Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture." Exp Cell Res **239**(2): 399-410.
- Squier, C. A. and M. J. Kremer (2001). "Biology of oral mucosa and esophagus." J Natl Cancer Inst Monogr(29): 7-15.
- Taihi, I., A. Nassif, et al. (2016). "Validation of Housekeeping Genes to Study Human Gingival Stem Cells and Their In Vitro Osteogenic Differentiation Using Real-Time RT-qPCR." Stem Cells Int **2016**: 6261490.
- Terada, M., K. Izumi, et al. (2012). "Construction and characterization of a tissue-engineered oral mucosa equivalent based on a chitosan-fish scale collagen composite." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **100**(7): 1792-1802.
- Thellin, O., B. ElMoualij, et al. (2009). "A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection." Biotechnol Adv **27**(4): 323-333.
- Tra, W. M., J. W. van Neck, et al. (2012). "Characterization of a three-dimensional mucosal equivalent: similarities and differences with native oral mucosa." Cells Tissues Organs **195**(3): 185-196.
- Vande Vannet, B. M. and J. L. Hanssens (2007). "Cytotoxicity of two bonding adhesives assessed by three-dimensional cell culture." Angle Orthod **77**(4): 716-722.
- Wang, H., J. Pieper, et al. (2005). "Synthetic scaffold morphology controls human dermal connective tissue formation." J Biomed Mater Res A **74**(4): 523-532.
- Warburton, G., S. Nares, et al. (2005). "Transcriptional events in a clinical model of oral mucosal tissue injury and repair." Wound Repair Regen **13**(1): 19-26.
- Wilhelm, J. and A. Pingoud (2003). "Real-time polymerase chain reaction." ChemBiochem **4**(11): 1120-1128.

7. Anhang

7.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Drei Säulen des Tissue Engineering "tissue engineering triad", verändert nach Scheller et al. (Scheller, Krebsbach et al. 2009).....	3
Abbildung 2: Mundschleimhauttypen nach Lage und Funktion, verändert nach Squier et al. (Squier and Kremer 2001).....	8
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der verhornten (A) und unverhornten (B) Mundschleimhaut, verändert nach Presland et al. (Presland and Dale 2000)	9
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Hemidesmosoms, verändert nach Borradori et al. (Borradori and Sonnenberg 1999)	12
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzsignals bei einer PCR mit lag-Phase (1), log-lineare Phase (2) und Plateau-Phase (3), der Schnittpunkt der Fluoreszenzkurve mit der Hintergrundfluoreszenz ist der C _t -Wert	17
Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse; das obere Diagramm zeigt die kontinuierliche Abnahme des Fluoreszenzsignals bei steigender Temperatur mit plötzlicher Abnahme des Fluoreszenzsignals bei Erreichen der Schmelztemperatur der PCR-Produkte, das untere Diagramm zeigt die erste negative Ableitung des Fluoreszenzsignals mit Schmelzkurven-Spitzen (Peaks) für kurze unspezifische Produkte (Primerdimere) (1), spezifische Produkte (2) und lange unspezifische Produkte (3).....	21
Abbildung 7: Übersicht der verschiedenen Quantifizierungsprinzipien bei der Real-time PCR	22
Abbildung 8: Aufbringen der Fibroblasten (grün) auf den Zellträger (blau) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb), der durch einen Metallring (lila) beschwert wird (A) und Fibroblastenkultur nach Entfernung des Rahmens (B)	30
Abbildung 9: Aufbringen der Fibroblasten (grün) auf den Zellträger (blau) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb), der durch einen Metallring (lila) beschwert wird (A), Fibroblastenkultur nach Entfernung des Rahmens (B), Aufbringen der Keratinozyten (rot) auf die Fibroblastenkultur (grün) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb) und Metallring (lila) (C), Fibroblasten- und Keratinozytenkultur nach Entfernung des Rahmens (D)	31
Abbildung 10: Aufbringen der Keratinozyten (rot) auf den Zellträger (blau) mit Rahmen aus Polystyrol (gelb), der durch einen Metallring (lila) beschwert wird (A) und Keratinozytenkultur nach Entfernung des Rahmens (B)	31
Abbildung 11: Fluoreszenzsignal einer Standardkurve mit jeweils vier Replikaten der vier Verdünnungsschritte und einer Negativkontrolle	35
Abbildung 12: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der RNA-Konzentrationen in µg/µl für die unterschiedlich kultivierten Proben auf DRT und TFE und die Summe der Monokulturen.....	43

Abbildung 13: Verhältnismuster von Kollagen IV (COL4A1) zu den Referenzgenen β -Actin (ACTB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bei den unterschiedlich kultivierten Proben und für den Kalibrator	45
Abbildung 14: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Kollagen IV auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$).....	47
Abbildung 15: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Laminin 1 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$).....	48
Abbildung 16: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Laminin 5 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$).....	49
Abbildung 17: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Keratin K14 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$).....	50
Abbildung 18: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der normalisierten Ratios von Keratin K13 auf den Scaffolds DRT und TFE getrennt für die verschiedenen Kultivierungsmethoden und die Summe der Monokulturen. * signifikant ($p \leq 0,2$), ** hoch signifikant ($p \leq 0,1$), *** höchst signifikant ($p \leq 0,05$).....	51

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 2: Für die Real-time PCR verwendete Primer.....	26
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	27
Tabelle 4: Verwendete Software	28
Tabelle 5: Standard-PCR-Bedingungen	38
Tabelle 6: PCR-Bedingungen in der Amplifikationsphase	39
Tabelle 7: PCR-Effizienzen für die einzelnen Gene	44
Tabelle 8: Mittelwerte der normalisierten Ratios auf DRT. M = arithmetisches Mittel, Md = Median, n = Probenanzahl.....	51
Tabelle 9: Mittelwerte der normalisierten Ratios auf TFE. M = arithmetisches Mittel, Md = Median, n = Probenanzahl.....	51
Tabelle 10: Mittelwertsvergleiche der normalisierten Ratios innerhalb der Scaffolds DRT und TFE. r = Effektgröße, p = Signifikanzwert.....	52

Tabelle 11: Mittelwertsvergleiche der normalisierten Ratios von DRT und TFE.
Bei „-“ kein Vergleich möglich, da beide Mittelwerte = 0. r = Effektgröße,
 p = Signifikanzwert 53

Tabelle 12: Signifikante Mittelwertsvergleiche ($p \leq 0,2$) der verschiedenen
Kulturmethoden auf DRT und TFE für die untersuchten Gene (Kollagen IV,
Laminin 1 und 5, Keratin K13 und K14). Md = Median, n = Probenanzahl,
 U = U-Wert (Mann-Whitney-U-Test), z = z-Wert, p = Signifikanzwert,
 r = Effektgröße 55

7.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar (10^{-6} mol/l)
3', 5'	Position des Kohlenstoffatoms der Ribose in der DNA/RNA
A	Adenin
ACTB	β-Actin
bp	Basenpaare
BP180	Bullöse-Pemphigoid-Antigen 2
BP230	Bullöse-Pemphigoid-Antigen 1
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL4A1	Kollagen IV
conc.	konzentriert
C _t -Wert	cycle threshold (Wert der den Beginn des exponentiellen Wachstums bei der Real-time PCR beschreibt)

d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DRT	Dermal Regeneration Template
E	PCR-Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fibroblasten
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
g	Gramm
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
HAM'S F12	Gerinnungsfaktor 12
K	Keratinocyten
KRT13	Keratin K13
KRT14	Keratin K14
l	Liter
LAMC1	Laminin 1
LAMC2	Laminin 5
<i>M</i>	Arithmetisches Mittel
M	Molar (1 mol/l)
<i>Md</i>	Median
MDB	Membran Desalting Buffer
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Mol

<i>n</i>	Probenanzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
<i>p</i>	Signifikanzwert
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
<i>r</i>	Effektgröße
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
T	Thymin
Taq-Polymerase	Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TFE	TissuFoil E
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>U</i>	U-Wert, Test-Statistik für Mann-Whitney-U-Test
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus (gegen)
<i>z</i>	z-Wert der z-Verteilung
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge

Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, besonders danke ich:

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler, Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer-, und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. med. dent. T. Reuther für die freundliche Überlassung des Themas, der Bereitstellung der Laborgeräte und des Arbeitsplatzes sowie die fachliche Betreuung.

Dr. rer. nat. U. Kriegebaum für die kompetente Anleitung und die konstruktiven Diskussionen während der Versuchsdurchführung.

Prof. Dr. hum. biol. Heike Walles für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Patienten und Ärzten der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die Bereitstellung der Gewebeproben.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des MKG-Forschungslabors für die gute Zusammenarbeit.

Dr. rer. nat., Dipl.-Psych. Andrea Beinicke für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Jan Uwe Berner für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Meiner Familie und Anne-Katrin Beurer für die Motivation bis zum Schluss.