

**Entwicklung eines gewebe-nahen Konstruktes aus einer
Matrix mit *in vitro* kultivierten Fibroblasten und
Keratinocyten zum Ersatz der Oralmukosa unter Einsatz
von Tissue Engineering**

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ulrike Kriegebaum
aus Schweinfurt

Würzburg, 2011

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: PD Dr. Dr. Tobias Reuther

Zweitgutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Danksagung

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Juli 2007 bis September 2010 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, vor allem danke ich

- Prof. Dr. Dr. A. C. Kübler für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes
- PD Dr. Dr. T. Reuther für die Idee, die kompetente Anleitung und Betreuung dieser Arbeit
- Prof. Dr. G. Krohne für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens
- Prof. Dr. Franz Jakob und Prof. Dr. Norbert Schütze des Orthopädischen Zentrums für Muskuloskelettale Forschung der Universität Würzburg für die Möglichkeit zur Teilnahme an ihrem wöchentlichen Seminar sowie die kompetente Hilfestellung in wissenschaftlichen Fragen und ihre Diskussionsbereitschaft
- Prof. Dr. Heike Walles vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg und PD Dr. Dr. Ralf Smeets vom Universitätsklinikum Aachen für die Überlassung ihrer Scaffolds
- den Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg für die Möglichkeit zur Benutzung von Laborgeräten sowie für die Hilfestellung bei der Elektronenmikroskopie
- den Patienten und Ärzten der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg für die Bereitstellung der Gewebeproben
- Meiner Arbeitsgruppe
- Meinen Freunden und meiner Familie, die mich immer unterstützt haben.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Zusammenfassung.....	6
II.	Summary	8
III.	Einleitung.....	10
1.	Die Mundschleimhaut.....	10
1.1	Funktion der Mundschleimhaut	10
1.2	Aufbau	12
1.2.1	Mundschleimhautepithel	13
1.2.2	Basalmembran	22
1.2.3	Lamina propria (Dermis)	25
1.2.4	Submukosa	28
2.	Tissue Engineering.....	29
2.1	Methode.....	30
2.2	Anwendungsgebiete	32
3.	Tissue Engineering von Haut und Oralmukosa, Stand der Forschung	33
3.1	Deckung von Epitheldefekten mit autologen Keratinozyten	34
3.2	Möglichkeiten und Grenzen kombinierter Transplantate, Kokulturen aus Fibroblasten und Keratinozyten.....	35
3.3	Klinische Bedeutung.....	36
4.	Ziel der Arbeit	37
IV.	Material.....	38
1.	Geräte	38
2.	Chemikalien, Verbrauchsmaterial	39
3.	Patienten und Untersuchungsmaterial	39
4.	Nährmedien, Zusätze und Puffer für die Zellkultur	40
4.1	Medien.....	40
4.2	Medienzusätze	41
4.3	Puffer und Lösungen.....	42

5. Zellträger	44
6. Enzyme und Laborkits	47
7. Zellen.....	48
8. Oligonukleotide.....	48
9. DNA-Größenmarker	50
10. Antikörper	51
11. Software	52
V. Methoden	53
1. Methoden der Zellbiologie	53
1.1 Isolation von primären humanen Zellen	53
1.1.1 Isolation von Fibroblasten	53
1.1.2 Isolation von Keratinozyten	54
1.1.3 Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen (mvEC)	54
1.2 Kultivierung der Zellen.....	55
1.2.1 Zellkultur.....	55
1.2.2 Passagierung	55
1.2.3 Zellzählung.....	56
1.2.4 Langzeitlagerung.....	57
1.2.5 Messung der Zellproliferation und Zellvitalität (WST-1/Zellzählung/ PDLs)	58
1.3 Besiedelung der Zellträger (Scaffolds)	60
1.3.1 Herstellung von Dermal-Äquivalenten (Fibroblasten auf Scaffolds).....	60
1.3.2 Herstellung von Oralmukosa-Äquivalenten (Fibroblasten und Keratinozyten auf Scaffolds)	61
1.3.3 Kultivierung der Oralmukosa-Äquivalente an der Luft-Flüssigkeits- Grenzfläche („Air Liquid Interface“)	62
2. Histologische Methoden	63
2.1 Vorbereitung der Gewebeproben für die Kryosektion	63
2.2 Herstellung und Aufbewahrung der Kryoschnitte	63
2.3 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	64
2.4 Indirekte Immunfluoreszenz	65
2.4.1 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten.....	66
2.4.2 Immunhistochemische Färbung von Zellen im „Chamber-Slide“	67
2.5 Direkte Fluoreszenzfärbung	67

3. Mikroskopie	68
3.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	68
3.2 Elektronenmikroskopie	68
3.2.1 Präparation der Proben (Fixierung, Entwässerung).....	68
3.2.2 Kritische Punk-Trocknung	68
3.2.3 Sputtern.....	68
3.2.4 Rasterelektronenmikroskopie.....	69
4. Methoden der Molekularbiologie	70
4.1 RNA-Isolierung	70
4.2 Qualitätskontrolle der RNA	70
4.3 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	71
4.4 Reverse Transkription	72
4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	73
4.5.1 Klassische PCR	73
4.5.2 Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)	77
5. Statistische Auswertung	81
VI. Ergebnisse	82
1. Etablierung der Isolation und Kultur primärer humaner Zellen der Oralmukosa	82
1.1 Isolation von Fibroblasten und Keratinozyten.....	82
1.2 Kultivierung der Zellen.....	84
1.2.1 Kultivierung von Fibroblasten.....	84
1.2.2 Kultivierung von Keratinozyten.....	86
1.3 Charakterisierung der Zellen	93
1.3.1 Charakterisierung von Fibroblasten	93
1.3.1.1 Immunhistochemische Färbungen	93
1.3.1.2 Replikationsverhalten und <i>in vitro</i> Alterung der Fibroblasten	94
1.3.2 Charakterisierung von Keratinozyten	95
1.3.2.1 Immunhistochemische Färbungen	95
1.3.2.2 Replikationsverhalten und <i>in vitro</i> Alterung der Keratinozyten	96
1.3.3 Vergleich des Replikationsverhaltens von Fibroblasten und Keratinozyten	99
1.4 Zellkultur von mikrovaskulären Endothelzellen (mvEC)	100
2. Charakterisierung der verwendeten Scaffolds.....	101
2.1 Verhalten der Scaffolds in Zellkulturmedium	101
2.2 Untersuchung der Scaffold-Oberfläche mittels Elektronenmikroskopie	102

2.3 Kryosektion der Scaffolds.....	103
3. Entwicklung von Dermal-Äquivalenten (DÄ) (Fibroblasten auf Scaffolds).....	105
3.1 Verschiedene Zellzahlen	105
3.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	105
3.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen	106
3.2 Verschiedene Aussaattechniken	107
4. Entwicklung von Oralmukosa-Äquivalenten (OMÄ) (Keratinocyten auf Dermal-Äquivalenten)	108
4.1 Submerskultur von Oralmukosa-Äquivalenten auf TFE, DRT und Vicryl	108
4.1.1 Untersuchung zur Bildung von Proteinen der Basallamina	113
4.1.1.1 Kollagen IV	113
4.1.1.2 Laminin	119
4.1.2 Differenzierungspotential (K13, K14)	122
4.2 Kultur von Oralmukosa-Äquivalenten am „Air Liquid Interface“	124
4.2.1 Kultur von OMÄs am „Air Liquid Interface“ auf DRT	124
4.2.1.1 Untersuchung zur Bildung von Proteinen der Basallamina und des Differenzierungspotentials	124
4.2.2 Kultur von OMÄs am „Air Liquid Interface“ auf „Small Intestinal Submucosa“ (SIS).....	129
4.2.2.1 Überblick und Aufbau der OMÄs auf SIS	130
4.2.2.2 Untersuchung zur Bildung von Proteinen der Basallamina und des Differenzierungspotentials	131
VII. Diskussion	136
1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von primären humanen Zellen der Oralmukosa	138
2. Generierung von Dermal- und Oralmukosa-Äquivalenten.....	143
2.1 Auswahl der Scaffolds	143
2.2 Entwicklung von Dermal-Äquivalenten	144
2.3 Entwicklung von Oralmukosa-Äquivalenten	145
3. Molekularbiologische Charakterisierung der Oralmukosa-Äquivalente	149
3.1 Marker der Basalmembran	149
3.2 Marker der Differenzierung.....	150
4. Fazit.....	152
5. Ausblick und Perspektiven	153

VIII. Literaturverzeichnis	155
IX. Anhang	165
1. Abbildungsverzeichnis.....	165
2. Abkürzungsverzeichnis	169
3. Publikationen und Tagungsbeiträge	172
3.1 Publikationen	172
3.2 Tagungsbeiträge.....	173

II. Zusammenfassung

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie besteht ein großer Bedarf an Transplantaten zur intra- und extraoralen Defektdeckung in der chirurgischen Therapie, insbesondere für die Rekonstruktion nach Traumen oder Tumorsektionen für den Erhalt von Funktion und Ästhetik. Konventionelle Methoden wie die Verwendung von autologen, freien Spalt- und Vollhaut-Transplantaten zeigen Nachteile wie z. B. die Entnahmemorbidität der Spenderregion oder die Notwendigkeit eines zweiten chirurgischen Eingriffs zur Deckung des Entnahmedefektes. Zudem sind diese Transplantate nur in kleinen Mengen verfügbar oder haben eine unterschiedliche Gewebestruktur sowie andere Keratinisierungsmuster. Diese Nachteile sollen mit Hilfe eines im *Tissue Engineering* hergestellten Oralmukosa-Äquivalentes umgangen werden.

Dazu wurden zunächst Methoden zur Isolierung und Kultivierung primärer, oraler Fibroblasten bzw. Keratinozyten entwickelt, die das Ausgangsmaterial für die Herstellung von Dermal-Äquivalenten bzw. von organotypischen Kokulturen *in vitro* bilden. Die Zellen wurden sowohl histologisch als auch immunhistochemisch charakterisiert und nach Optimierung der Kulturbedingungen zur Entwicklung von Oralmukosa-Äquivalenten (OMÄs) eingesetzt. Dabei ist auch die Wahl eines geeigneten Trägermaterials ein entscheidender Faktor. Deshalb wurden in dieser Arbeit verschiedene Unterlagen auf Eignung als Scaffold für das *Tissue Engineering* von Oralmukosa getestet. Unter anderem wurden die Materialien Vicryl (resorbierbares Polyglactin-910-Netz), DRT (dermale Regenerationsmatrix aus bovinem Kollagen-I vernetzt mit einem Glycosaminoglycan) und TFE (equine Kollagen-I-Membran) in Zellkulturversuchen auf Biokompatibilität und Stabilität geprüft. Dazu wurden zunächst Fibroblasten auf die Scaffolds ausgesät um Dermal-Äquivalente (DÄs) zu erhalten. Das Wachstum der Zellen wurde mittels Elektronenmikroskopie sowie immunhistochemischen Methoden untersucht. Die Analyse zeigte gutes Zellwachstum und somit gute Biokompatibilität auf allen verwendeten Materialien. In folgenden Experimenten wurden zusätzlich Keratinozyten auf DÄs ausgesät und somit organotypische OMÄs entwickelt. Die generierten Konstrukte wurden mit Hilfe von IIF-Färbungen von Kryoschnitten sowie RT-qPCR bezüglich ihrer Zellarchitektur, ihrer Fähigkeit zur Bildung einer Basalmembran und ihrer Fähigkeit zur Differenzierung untersucht. Es stellte sich heraus, dass auf allen drei Trägern Fibroblasten-Keratinozyten Kulturen hergestellt werden konnten. Dabei zeigte Vicryl eine gute Biostabilität, jedoch ohne Ausbildung der natürlichen Stratifizierung der Keratinozytenschichten. Auf TFE dagegen zeigte sich die beste Architektur und Proliferation der Zellen mit Stratifizierung der Keratinozyten, allerdings eine schlechte Biostabilität. DRT stellte sich als die Matrix heraus, die die gewünschten

Eigenschaften am besten vereint. Das Ergebnis war jedoch im Bezug auf die Dicke der Epithelschicht sowie deren Differenzierung und Ausbildung einer Basalmembran noch zu verbessern. Dies konnte mit Hilfe der Kulturmethode an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche erreicht werden. Jedoch gelang bezüglich der Zellarchitektur noch immer kein optimales Ergebnis. Erst der Einsatz einer weiteren Membran, SIS (azellularisierter Schweinedarm), die durch ihren natürlichen Ursprung ähnlich strukturiert ist wie humane Submukosa, zeigte, dass die angewandte Methodik zur Herstellung von OMÄs funktionierte. Auf diesem Träger gelang die Herstellung eines Transplantates, das eine mit normaler Oralmukosa vergleichbare, reguläre Zellarchitektur mit dermalen und epidermalen Komponenten aufwies, die qualitativ noch besser war als auf TFE. Auch die Biostabilität während des Versuchszeitraumes war wie bei Vicryl und DRT gegeben. Die Neusynthese einer Basalmembran konnte mittels IIF-Färbung nachgewiesen werden. Die Proliferation der Keratinozyten war in der Basalschicht lokalisiert und nahm Richtung apikal ab. Lediglich eine Differenzierung des Transplantates war mittels immunhistochemischer Methoden nicht nachweisbar.

Auf diese Weise konnte in der vorliegenden Arbeit ein OMÄ entwickelt werden, dessen Aufbau mit dem von natürlicher Oralmukosa vergleichbar war. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse dienen somit als Grundlage zur Optimierung und Verwirklichung des klinischen Einsatzes von mittels *Tissue Engineering* hergestellten, autologen OMÄs.

II. Summary

In oral and maxillofacial surgery, there is a great demand for oral mucosa equivalents for intra- and extraoral grafting as oral reconstruction after trauma or tumor resections to preserve function and aesthetics. Current methods of covering intraoral defects with autologous epidermal and dermal grafts show disadvantages, e.g. donor site morbidity or the need for a second surgical procedure to cover the harvesting site. These grafts are either only available in small amounts or have a different texture, such as a different keratinization pattern. These disadvantages could be avoided by using autologous tissue engineered mucosa equivalents.

In a first step, a method for isolation and cultivation of primary oral fibroblasts and keratinocytes was developed. They formed the starting material for production of dermal equivalents (DEs) and organotypic cocultures *in vitro*. The cells were characterized both by histological staining and by immunohistochemical staining. After optimization of the cell culture conditions they were used for the development of oral mucosa equivalents (OMEs). Thereby the selection of a suitable scaffold is a decisive factor. Therefore, different matrices for the tissue engineering of oral mucosa have been studied in this thesis. Amongst others, the materials Vicryl (woven membrane of polyglactin 910), DRT (dermal regeneration template of cross-linked bovine tendon collagen and a glycosaminoglycan) and TFE (equine collagen I membrane) have been tested in cell-culture experiments for biocompatibility and stability. For this purpose first only fibroblasts were seeded on scaffolds to obtain DEs. Cell growth was examined by electron microscopy and immunohistochemical methods. The analysis showed good cell growth and good biocompatibility as well on all the used materials. In following experiments keratinocytes were seeded on dermal equivalents to develop organotypic co-cultures. The obtained constructs were characterized by immunohistochemical staining and gene expression analysis using RT-qPCR to get information about cell architecture, formation of a basal membrane and status of differentiation. It has been found, that it was possible to create fibroblast-keratinocyte-cultures on all three scaffolds. Thereby Vicryl showed a good biostability but no formation of the natural stratification of the epidermal cells. These findings are in contrast to the results on TFE. Here was the best architecture and proliferation of the cells with stratification of the newly formed epidermis, but bad biostability of the membrane. The combination of the desired properties could only be seen on DRT, but the thickness, differentiation and basal membrane formation of the epithelial layer needed to be improved. This was achieved by cultivation of the cells in the air liquid interface but there was still no optimal result. Only the use of another scaffold, SIS (acellular matrix from porcine small bowel) which has a similar

structure to humane submucosa, shows functionality of the developed method of OME generation. On this scaffold the generation of a transplant succeeded even better than on TFE. It had dermal and epidermal components with regular cell architecture like native oral mucosa. Also the biostability during the experimental period was comparable with Vicryl and DRT. It has been possible to demonstrate the formation of a basal membrane by IIF staining. Keratinocyte proliferation was localized in the basal layer with declining proliferation activity in apical direction. Only differentiation could not be proven by means of immunohistochemistry.

Thus the present thesis developed a method for creation of an OME with comparable organization to that of the native oral mucosa. The findings summarized in this study will serve as basis for optimization and realization of the clinical use of tissue engineered autologous OMEs.

III. Einleitung

1. Die Mundschleimhaut

1.1 Funktion der Mundschleimhaut

Die Schleimhaut des Mundes (Tunica mucosa oris) überzieht die inneren Oberflächen im Bereich des Mundvorhofs, der Mundhöhle, der vorderen Nasenhöhle und des Rachenraums und stellt ein Organ mit vielfältigen Aufgaben dar (Gührung and Barth, 1992).

Sie unterstützt nicht nur motorische Funktionen wie das Sprechen, Schlucken oder Kauen; sie hat auch sekretorische, sinnesphysiologische, resorptive und protektive Aufgaben.

Die sekretorischen Aufgaben werden von den Speicheldrüsen übernommen. Speichel ist nicht nur bei der Nahrungsaufbereitung von Bedeutung. Er ist auch für die Sprachfunktion, die Mineralisation und Reinigung der Zähne sowie den Schutz vor Infektionen, thermischen und chemischen Noxen einschließlich Allergene zuständig. Neben Mucinen und Alpha-Amylase werden weitere Eiweiße, darunter Enzyme und Immunglobuline sowie Lipide, Glucose, Elektrolyte und Jod sezerniert.

Die Resorptionsleistung der Mundschleimhaut ist von der chemischen Beschaffenheit einer Substanz abhängig. Da so eine schnelle Wirkstoffaufnahme in den Organismus möglich ist, wird sie für die Pharmakotherapie genutzt. Die Wangentaschen und sublinguale Bereiche der Mundschleimhaut besitzen das beste Resorptionsvermögen.

Des Weiteren dient die Mundschleimhaut als Schutzbarriere. Durch ihre feuchte Oberfläche ist sie widerstandsfähig gegenüber mechanischen Einwirkungen und schützt so die Atem- und Verdauungswege. Auf zellulärer Ebene werden immunologische Schutzfunktionen z. B. von den Langerhans-Zellen wahrgenommen. Die Sekretion von Immunglobulinen, vor allem Immunglobulin A (IgA), schützt gegen das Eindringen von Mikroorganismen und sorgt so für eine Balance zwischen saprophytären und parasitären Keimen (Barth et al., 1991).

Die komplexen sensorischen Aufgaben übernehmen freie Nervenendigungen, Thermo- und Mechanorezeptoren sowie Geschmacksknospen, die besonders auf der Schleimhautoberfläche der Zunge angeordnet sind (Gutwald et al., 2003).

Je nach Funktion und Struktur unterscheiden sich drei verschiedene Schleimhauttypen (Abbildung 1) (Barth et al., 1991, Jackowski et al., 2007, Lüllmann-Rauch, 2003).

Auskleidende Schleimhaut:

Die auskleidende Schleimhaut besitzt ein nicht verhorntes Epithel, meist ist eine Submukosa mit Drüsen vorhanden. Die Lamina propria enthält relativ lockeres Bindegewebe, das aus elastischen Fasern besteht. Lippen, Wangen, Mundvorhof, Mundboden, Zungenunterseite, Alveolarfortsätze und weicher Gaumen sind von ihr bedeckt. Ihre Dicke liegt zwischen 0,1 mm im Bereich des Mundbodens und 0,5 mm im Bereich der Wange.

Mastikatorische Schleimhaut:

Bei der mastikatorischen Schleimhaut handelt es sich um Schleimhaut, die beim Kauen beansprucht wird. Ihr Epithel ist verhornt (para- oder orthokeratinisiert) und ihre Bindegewebspapillen stehen dicht und hoch. Deshalb ist diese Schleimhaut unverschieblich an ihrer Unterlage (Periost, Zahn) befestigt. Sie kommt z. B. an der Gingiva oder am harten Gaumen vor.

Spezialisierte Schleimhaut:

Die spezialisierte Schleimhaut kommt auf dem Zungenrücken vor und ist in den vorderen Abschnitten orthokeratinisiert. In den hinteren Abschnitten ist sie nicht keratinisiert, formt jedoch Krypten, die von lymphatischem Gewebe umgeben sind. Das Epithel dieser Schleimhaut besitzt sensorische Funktionen zur Herstellung der Geschmacksfunktion und ist unmittelbar mit der Zungenmuskulatur verbunden.

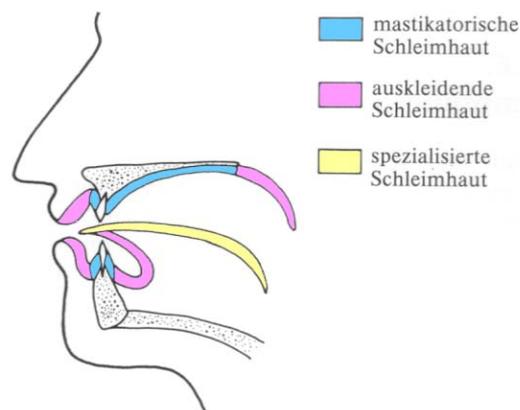


Abbildung 1:
Funktionsbereiche der Mundschleimhaut
(Barth et al., 1991)

1.2 Aufbau

Die Mundschleimhaut stellt nur weniger als 5 % der gesamten Körperoberfläche dar. Dennoch ist sie ein hoch spezialisiertes Gewebe (Scheller et al., 2009). Mundschleimhaut ist wie die äußere Haut aus drei Schichten aufgebaut, dem Schleimhautepithel (Epithelium mucosae), dem Schleimhautbindegewebe (Lamina propria mucosae) und dem Unterschleimhautbindegewebe (Tela submucosa) (Abbildung 2). Ausnahmefälle wie z. B. die gingivale Schleimhaut bestehen jedoch nur aus zwei Schichten: dem Epithel und der Lamina propria (Jackowski et al., 2007). Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich die Basalmembran.

Im Unterschied zur übrigen Haut enthält die Mundschleimhaut keine Haarfollikel und keine Schweißdrüsen. Auch Talgdrüsen sind lediglich im Lippenrot der Lippenschleimhaut zu finden. Gegenüber mechanischen Irritationen und Traumata zeigt Mundschleimhaut einen geringeren Widerstand als normale Haut. In den Bindegewebeschichten der Schleimhäute sind keine Speicheldrüsen eingelagert. Eine Ausnahme bildet auch hier wieder die Gingiva. Mundschleimhaut liegt je nach Region keratinisiert (verhornt) oder nicht keratinisiert (unverhornt) vor. In Bereichen mit starker mechanischer Belastung, wie bei der mastikatorischen Schleimhaut, ist das Schleimhautepithel verhornt und durch dicht stehende und große Papillen mit dem Schleimhautbindegewebe stark verzahnt wie z. B. bei der Schleimhaut des harten Gaumens oder der Gingiva. Auf diese Weise ist die Schleimhaut unverschieblich mit der Unterlage verbunden. In weniger beanspruchten Regionen kommt die Schleimhaut unverhornt, weniger verzapft und verschiebbar gegen ihre Unterlage vor (Gührung and Barth, 1992).

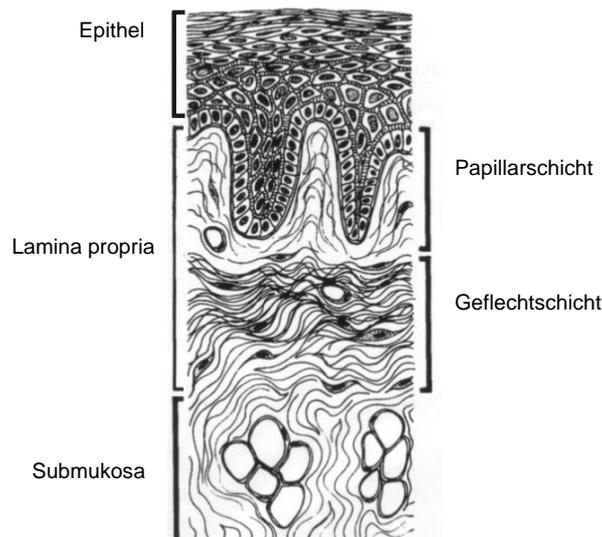


Abbildung 2:

Die drei Schichten der Mundschleimhaut: Epithel, Lamina propria, die aus Papillarschicht und Geflechschicht zusammengesetzt ist und Submukosa
Verändert nach Avery, 1994

1.2.1 Mundschleimhautepithel

Das Epithel der Mundhöhle leitet sich vom embryonalen Ektoderm ab und ist durchweg als mehrschichtiges Plattenepithel zu bezeichnen, das hauptsächlich aus dicht gepackten Keratinozyten besteht. Diese differenzieren von basal nach apikal, während sie zur Hautoberfläche migrieren.

Zusätzlich zu Keratinozyten enthält orales Epithel Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen, die zusammen einen Gesamtanteil von ca. 10 % ausmachen. Die Adhäsion zwischen den epithelialen Zellen wird über Desmosomen erreicht (siehe Zellverbindungen und Zellkontakte in der Epidermis S. 20). Die Basalschicht ist mit der darunter liegenden Lamina Propria über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verknüpft.

Epithelzellen produzieren im Gegensatz zum Bindegewebe nur an ihrer basalen Oberfläche extrazelluläre Matrix und bilden viele Zellkontakte. Der größte Teil der mukosalen Oberfläche wird von nicht keratinisiertem (unverhorntem) Plattenepithel bedeckt, mit Ausnahme der Gingiva, des harten Gaumens und der dorsalen Oberfläche der Zunge, wo ein keratinisiertes (verhorntes) Epithel vorkommt (Avery, 1994). Die Keratinisierung beinhaltet die Transformation von lebenden Keratinozyten in tote Zellen ohne Organellen, dafür dicht gepackt mit Zytokeratin-Filamenten (Moharamzadeh et al., 2007).

Die Zellen des verhornten Epithels formen vier funktionell verschiedene Schichten, wobei jede ihre eigene Morphologie besitzt (Abbildung 4). In nicht verhornten oralen Epithelien wird die Körnerschicht (Stratum granulosum) und die Stachelzellschicht (Stratum spinosum) durch die Zwischenschicht (Stratum intermedium) ersetzt, die Hornschicht (Stratum corneum) durch die Oberflächenschicht (Stratum superficiale) (Abbildung 3).

Basalschicht (Stratum basale):

Die Zellen der Basalzellschicht sind würfel- oder leicht säulenförmig und bilden eine einzelne Schicht, die der Epithelseite der Basalmembran aufliegt. Keratinozyten dieser Schicht sind Progenitorzellen. Nur sie können DNA synthetisieren und sich teilen (Fuchs, 1990a) und ersetzen so die Zellen, die an der Oberfläche verloren gehen. Deshalb wird diese Schicht auch als Keimschicht (Stratum germinativum) bezeichnet.

Stachelzellschicht (Stratum spinosum):

Diese Schicht aus mehreren Zelllagen lebender Zellen enthält voluminöse, polygonale Keratinozyten, die viele Keratinfilamentbündel enthalten. An ihren Oberflächen bilden sie feine, stachelförmige Fortsätze aus. Durch starke desmosomale Zell-Zellkontakte an den Enden der feinen Fortsätze entsteht die histologisch stachelige Form (Welsch, 2006). Vereinzelt kommen in den unteren Zelllagen noch Zellteilungen vor. In den apikalen Schichten des Stratum spinosum enthalten die Zellen Zytoplasma-Einschlüsse, die als Lamellenkörper („*membrane-coating granules*“) bezeichnet werden. Diese enthalten Proteine und verschiedene Lipide. Durch Fusion mit der Zytoplasmamembran der Zelle geben sie ihre Inhaltsstoffe in die Interzellularräume frei (Avery, 1994).

Körnerschicht (Stratum granulosum) / Zwischenschicht (Stratum intermedium):

Die Zellen des Stratum granulosum sind abgeflacht und kommen in 3 - 5 Zelllagen vor. Durch die in den Keratinozyten lagernden basophilen Granula aus Keratinfilamenten und Keratohyalin (Keratohyalin granula) erscheint diese Hautschicht, in der die Verhornung der Zellen beginnt, körnig. Die Keratohyalin granula helfen dabei die Matrix für die vielen Keratinfasern zu formen, die in den äußeren Hautschichten vorhanden sind (Avery, 1994). In nicht-verhornten oralen Epithelien ist statt der Körnerschicht die Zwischenschicht (Stratum intermedium) vorhanden, die Zellen ohne Keratohyalin granula enthält (Moharamzadeh et al., 2007, Presland and Dale, 2000).

Hornschicht (Stratum corneum) / Oberflächenschicht (Stratum superficiale):

Der Übergang zwischen den kernhaltigen Zellen des Stratum granulosum und dem Stratum corneum ist scharf abgegrenzt. Zellen des Stratum corneum sind abgeflacht, kernlos und angefüllt mit Keratinfilamenten, die von einer Matrix umgeben sind. Sie werden kontinuierlich abgeschilfert und gehen dadurch verloren. Die Migration der Zellen der darunter liegenden Schichten sorgt jedoch für Nachschub. In nicht keratinisierten Epithelien z. B. im Bereich der Wangen oder des weichen Gaumens wird diese Schicht mangels verhornter Keratinfilamente Oberflächenschicht genannt (Avery, 1994). Diese Zellen erscheinen ungleichmäßiger und sind durch intrazelluläre Lücken weit voneinander getrennt (Garant, 2003).

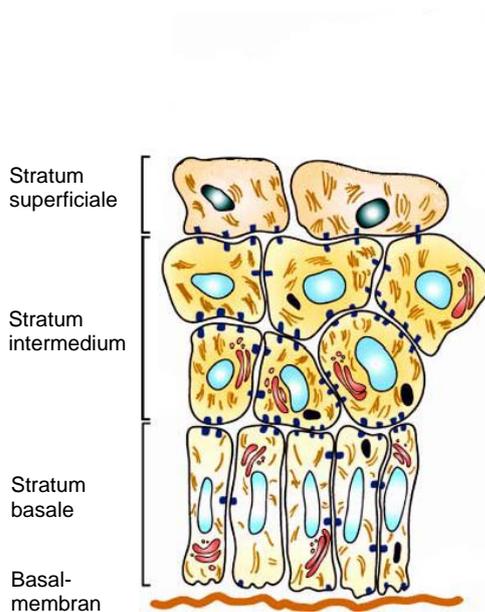


Abbildung 3:
Schematischer Aufbau einer nicht verhornten oralen Epidermis. Verändert nach Fuchs, 2008; Presland and Dale, 2000

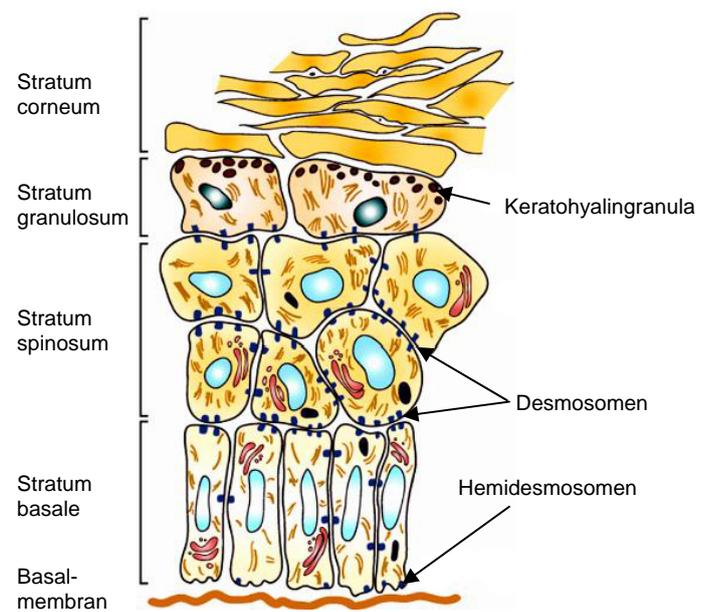


Abbildung 4:
Schematischer Aufbau einer verhornten oralen Epidermis. Verändert nach Fuchs, 2008; Presland and Dale, 2000

Homöostase

Durch regulierte Proliferation und Differenzierung erneuern Keratinozyten das orale Epithel während der Gewebekomöostase innerhalb von 12 - 13 Tagen (Avery, 1994) und sind damit schneller als bei der Erneuerung des Epithels der Haut (ca. 28 Tage). Dabei ist die Rate der neu gebildeten Zellen im Gleichgewicht mit den Zellen, die verloren gehen (Bickenbach, 1981). Die Selbsterneuerung der Mundschleimhaut beruht auf einer kleinen Subpopulation von basalen Zellen, die als epidermale Stammzellen bezeichnet werden. Nur diese adulten (somatischen) Stammzellen besitzen die Fähigkeit über die gesamte Lebenszeit neue Zellen zu regenerieren. Sie machen ca. 8 - 10 % der basalen Zellen aus (Dabelsteen and Mackenzie, 2006). Neben diesen Zellen kommen in der Basalschicht noch zwei weitere Zellarten vor, die sich funktionell unterscheiden: die transient amplifizierenden Zellen, die direkt aus Teilungen von Stammzellen entstehen und zu einigen weiteren Zellteilungen fähig sind und die postmitotischen Zellen, die sich nicht mehr teilen können und dabei sind, aus der Basalschicht zu emigrieren (Abbildung 5) (Mackenzie, 2005, Watt, 1998).

Von diesen drei Zellarten exprimieren die Stammzellen am meisten β 1-Integrine gefolgt von den transient amplifizierenden Zellen. Diese Rezeptoren der extrazellulären Matrix scheinen für den Erhalt der Stammzeleigenschaften notwendig zu sein (Rzepka et al., 2005). Sie regulieren nicht nur die Initiation der terminalen Differenzierung und vermitteln Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte (Levy et al., 2000), sondern können dazu benutzt werden jede Subpopulation an Keratinozyten zu isolieren (Watt, 1998).

In normaler Haut befindet sich das Reservoir epidermaler Stammzellen in der interfollikulären Epidermis, der Haarbalgregion und der germinalen Haarfollikelmatrix (Rzepka et al., 2005). In oralen Epithelien sind die Stammzellen dagegen an den Profiltälern der Epithelfortsätze in der Papillarschicht zwischen Dermis und Epidermis angeordnet (Dabelsteen and Mackenzie, 2006) (Abbildung 5, 6). Auch die transient amplifizierenden Zellen sind in diesem Bereich in den Profilsitzen angeordnet, während die postmitotischen, suprabasalen Zellen über der stark verzahnten Region vorkommen (Abbildung 5, 6).

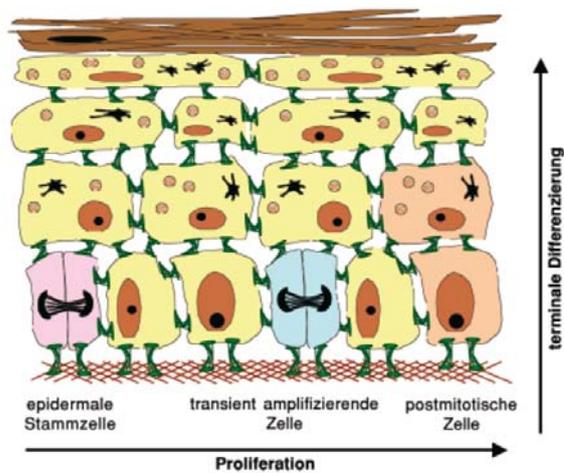


Abbildung 5:
Organisation epidermaler Stammzellen, transient amplifizierender Zellen und postmitotischer Zellen im Stratum germinativum (Rzepka et al., 2005)

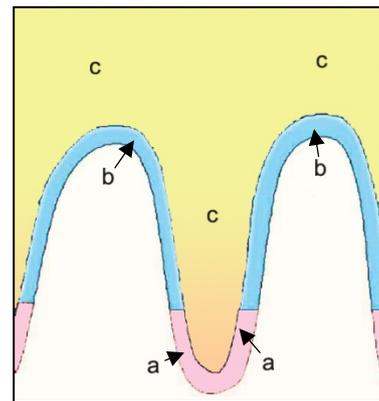


Abbildung 6:
Muster der Stammzell-Verteilung in oralen Epithelien
a: epidermale Stammzellen;
b: transient amplifizierende Zellen;
c: postmitotische, suprabasale Zellen (Dabelsteen and Mackenzie, 2006)

Differenzierung und Keratinisierung

Die Keratinozyten durchlaufen ein in seiner Abfolge genau aufeinander abgestimmtes Programm der Differenzierung während sie die in Kapitel III. 1.2.1 beschriebenen Schichten von basal nach apikal passieren. Es kommt nicht nur zu morphologischen, sondern auch zu biochemischen Veränderungen in der Zelle (Fuchs, 1990a). Je nach Differenzierungsstatus und Zelllage ändert sich dabei auch das Zytokeratin-Expressionsprofil der Keratinozyten. Es spiegelt sowohl den Zelltyp als auch den Differenzierungsstatus in verschiedenen Typen und verschiedenen Schichten der Epithelien wieder und kann so als Marker der epithelialen Differenzierung verwendet werden (Moharamzadeh et al., 2007). So enthalten die inneren Schichten der Epidermis kleine Zytokeratine (46 - 58 kDa), die 30 % der Proteine der basalen Zellen darstellen. In den äußeren Schichten sind zusätzlich große Zytokeratine (63 - 67 kDa) vorhanden. Die Keratinmenge beträgt 85 % der Gesamt-Proteinmenge in voll differenzierten Plattenepithelien (Fuchs, 1990b, Fuchs and Green, 1980). Zytokeratine sind Intermediärfilamente, die in allen Typen von Epithelien gefunden werden. Zusammen mit den Mikrotubuli (Tubulin) und den Mikrofilamenten (Aktin) formen sie das Zytoskelett epidermaler Zellen (Steinert and Roop, 1988). Anhand ihrer Aminosäuresequenz lassen sich Keratine in zwei Gruppen einteilen: Typ I-Keratine sind sauer, während Typ II-Keratine basisch oder neutral sind. So formen sich Heterodimere jeweils aus einem Typ I- und einem Typ II-Keratin. Basale Zellen exprimieren in allen mehrschichtigen Epithelien die Keratine K5 und K14 (Abbildung 7) (Tomakidi et al., 1997). Mit dem Eintritt der Keratinozyten in die Stachelzellschicht kommt es zu transkriptionellen Veränderungen, wobei bei oralen Epithelien zwei verschiedene Signalwege für verhornte und nicht verhornte Epithelien eingeschlagen werden (Garant, 2003). Die Expression der Keratine K5 und K14 endet und wird in verhornten Epithelien von der Expression des Keratin-Paares K1/K10 ersetzt (Abbildung 7) (Fuchs, 1990b). In nicht verhornten Epithelien werden dagegen in den suprabasalen Zellen vorwiegend die Keratine K4 und K13 exprimiert (Tomakidi et al., 1997).

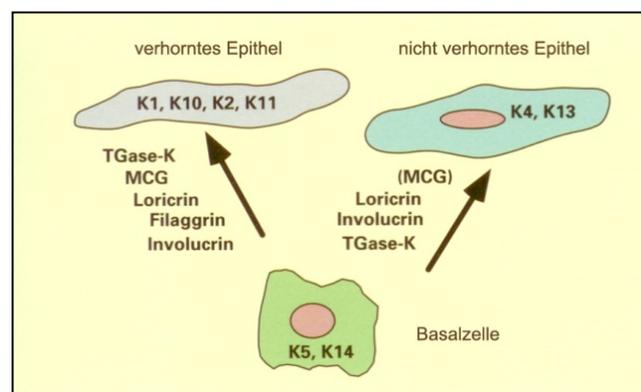


Abbildung 7:

Expression von Genprodukten während der Differenzierung in verhornten und nicht verhornten Epithelien. Verändert nach Garant, 2003

Mit fortschreitender Differenzierung kommt es in Zellen des Stratum granulosum zur Synthese von Hüll- und Strukturproteinen, die neben den Keratinen auch in Zellen des Stratum corneum vorkommen, wie z. B. Loricrin, ein Prolin-reiches Hüllprotein, das mit 65 - 85 % den Hauptteil der gesamten quervernetzten Proteine ausmacht. Das cytosolische Hüllprotein Involucrin, das mit Hilfe des Enzyms Transglutaminase durch Isopeptidbindungen quervernetzt wird, lagert sich von innen an die Plasmamembran an, um diese zu verstärken (Presland and Dale, 2000, Simon and Green, 1984).

Filaggrin, ein Keratin-assoziiertes Strukturprotein, wird über seinen Vorläufer Profilaggrin synthetisiert und stellt den Hauptbestandteil der Keratohyalin granula dar. Keratohyalin granula sind nicht Membran-gebundene cytoplasmatische Organellen, die histologisch gut sichtbar sind (Abbildung 4). Die Aufgabe des Filaggrin ist es Keratinfilamente zu dicht angeordneten Bündeln oder Makrofibrillen zu aggregieren und somit die Zellform zu ändern und das Zytoplasma zu verdichten (Günzel et al., 1991, Presland and Dale, 2000). Es ist das interfilamentäre Matrixprotein in Zellen des Stratum corneum und sorgt dort für die mechanische Festigkeit (Dale et al., 1985). Diese Proteine dienen als späte Differenzierungsmarker vor allem bei keratinisierten Epithelien (Abbildung 7). Obwohl einige Hüllproteine wie Loricrin und Involucrin auch in differenzierten Zellen nicht verhornter Epithelien gebildet werden ist die fertige Zellhülle weder so dick, noch so widerstandsfähig wie in verhornten Epithelien (Garant, 2003).

Die Differenzierung wird durch autokrine und parakrine Faktoren, die von Keratinozyten gebildet werden, durch Zytokine und Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- α) (Gibbs et al., 1998, Ponec et al., 1997a) aus dem darunter liegenden Bindegewebe und durch zirkulierende systemische Faktoren reguliert (Garant, 2003). Folgende weitere Faktoren beeinflussen die Differenzierung: Vitamine (Ponec et al., 1997b), Temperatur (Gibbs et al., 1998, Ponec et al., 1997a), Retinoide und die Kalziumkonzentration (Elias et al., 1998, Presland and Dale, 2000). Sie steigern die Transkription ihrer Zielgene oder regulieren die Aktivität von Enzymen, die an dem Differenzierungsprozess beteiligt sind, wie Transglutaminasen, Proteinasen und Proteinkinasen (Presland and Dale, 2000).

Zellverbindungen und Zellkontakte in der Epidermis

In allen Geweben befinden sich zahlreiche Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontaktstellen, wobei sie in Epithelien besonders zahlreich vorhanden sind.

Sie lassen sich je nach Funktion und molekularer Zusammensetzung in verschiedene Klassen einteilen (Abbildung 8) (Green and Gaudry, 2000):

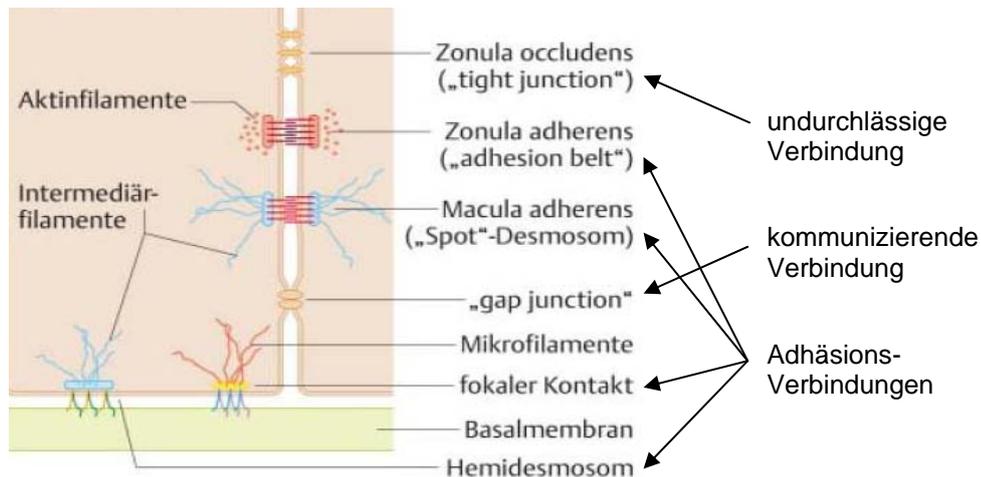


Abbildung 8:
Epitheliale Kontaktstellen (Wagener and Müller, 2009)

Undurchlässige Verbindungen:

Zonula occludens (engl. „*tight junction*“) dienen als selektive Permeabilitätsbarriere zwischen Lumen und Interzellularraum (Wagener and Müller, 2009) und verhindern bzw. kontrollieren den parazellulären Transport von Molekülen über das Epithel (Barrierefunktion). Sie haben die Form schmaler Bänder aus Transmembranproteinen wie Occludin und Claudin, die die Epithelzellen vollständig umgürten und über Plaqueproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft sind (Mitic et al., 2000). Membrankomponenten werden so an der freien Bewegung gehindert und erhalten die Zellpolarität von apikal nach basal (Zaunfunktion) (Green and Gaudry, 2000, Tsukita and Furuse, 1999).

Kommunizierende Verbindungen:

Kommunizierende Verbindungen (engl. „*gap junctions*“) erlauben die Passage von chemischen Signalen von Zelle zu Zelle. Diese Art von zellulärer Kommunikation ist für die Aufrechterhaltung der Homöostase, die Zellsynchronisierung, die Differenzierung, das Zellwachstum und die metabolische Koordination besonders wichtig. Sie bestehen aus Clustern von Transmembrankanälen, die die Zytoplasmen von angrenzenden Zellen direkt verbinden. Diese werden aus Halbkanälen, den Connexons, gebildet, wobei jede beteiligte

Zelle einen Halbkanal beisteuert. Die Connexons wiederum bestehen aus 6 konzentrisch angeordneten Connexin-Proteinen, die von einer Genfamilie codiert werden. Das Expressionsmuster einiger Connexine unterscheidet sich wie das der Keratine je nach Differenzierungszustand der Zellen (Mese et al., 2007, Simon and Goodenough, 1998).

Adhäsions-Verbindungen:

Diese Verbindungen sind die Schlüssel-Zell-Zellverbindungen in mehrschichtigen Epithelien und verbinden die Zellen mechanisch (Garant, 2003). Es lassen sich funktionell zwei Gruppen unterscheiden: Zell-Zellkontakte und Zell-Matrixkontakte.

Zu den Zell-Zellkontakten gehören Desmosomen (Macula adherens) und Adhärenzverbindungen (Zonula adherens). Desmosomen sind interzelluläre Kontaktstellen und stellen enge, scheibenförmige Verbindungen zwischen zwei Zellen her. Sie sind aus Proteinen der drei Familien der Cadherine, Armadillo-Proteine und Pleckstrin aufgebaut (Green and Gaudry, 2000) und ändern ihre Zusammensetzung und Struktur im Zuge der epidermalen Differenzierung. Die Aufgabe von Desmosomen ist es Intermediärfilamente (Keratinfilamente) verschiedener Zellen zu verankern. Auf diese Weise sind sie an der plastischen Formgebung des Epithels beteiligt und verleihen ihm Widerstand gegen Zugkräfte. Adhärenzverbindungen stellen Verbindungen zwischen den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts zweier Zellen her. Dabei ist das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin von herausragender funktioneller Bedeutung. In Epithelien bildet die Zonula adherens oft direkt unterhalb der Zonula occludens einen Adhäsionsgürtel aus Bündeln von Aktinfasern, die an der Innenseite der Zellen entlanglaufen (Wagener and Müller, 2009).

Die zu den Zell-Matrixkontakten gehörenden Hemidesmosomen sind strukturell und funktionell unterschiedlich zu den Desmosomen (Gumbiner, 1996). Sie liegen an der Grenze zur extrazellulären Matrix (ECM) und dienen der Verankerung der Basalmembran. Als extrazelluläre Adhäsionsmoleküle dienen hier Integrine, deren extrazelluläre Domänen an Laminin-Proteine der Basallamina binden (Wagener and Müller, 2009). Auch fokale Kontakte verbinden das Aktin-Zytoskelett von Zellen mechanisch mit Matrixmolekülen. Sie dienen nicht nur der Verankerung von Zellen, sondern auch als Signalüberträger, um die Zelle über den Zustand der ECM zu informieren und ihr Verhalten zu beeinflussen (Riveline et al., 2001).

1.2.2 Basalmembran

Die Basalmembran (Basallamina) bildet die Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis. Sie ist ein zweidimensionales Proteinaggregat, das hauptsächlich aus Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Nidogen (Entactin) und Proteoglycan (einschließlich Perlecan) besteht (Abbildung 9). Diese Proteine der ECM bilden ein makromolekulares Netzwerk, das die Aufgabe hat, Epithelzellen zu versorgen und als Permeabilitätsbarriere oder Filter zu dienen (Garant, 2003). Sie werden sowohl von Keratinozyten als auch von Fibroblasten synthetisiert (Woodley et al., 1988b). Basalmembranen spielen durch Übermittlung und Indizierung von Signalen eine fundamentale Rolle bei der zellulären Differenzierung, Migration und Proliferation. Des Weiteren dienen sie als Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine (Mokkapati et al., 2008).

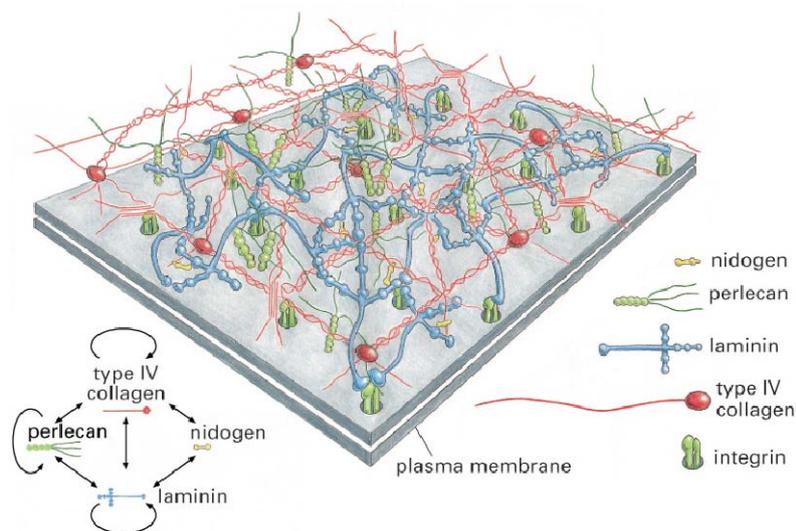


Abbildung 9:
Hauptbestandteile der Basalmembran (Alberts et al., 2004)

Lange glaubte man, dass die Basalmembran aus zwei Schichten besteht: die Lamina lucida und die Lamina densa, die sich in fixierten Präparaten elektronenmikroskopisch mit unterschiedlicher Elektronendichte darstellt. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die Lamina lucida, eine helle Fläche zwischen der Lamina densa und der Zellmembran, lediglich ein Artefakt ist, das während der Dehydrierung der Gewebepreparation entsteht (Chan et al., 1993).

Kollagen IV ist der Hauptbestandteil der Lamina densa. Die Kollagen IV-Moleküle bilden ein Netzwerk, das eine Porengröße von 8 – 20 nm besitzt. Somit ist Kollagen IV ein nicht fibrilläres Kollagen, das aus Prokollagen-Molekülen zusammengesetzt ist.

Ebenso formt **Laminin 1** ein Netzwerk, das jedoch weniger stabil ist als das Kollagen IV-Netzwerk, da ihm die kovalenten Bindungen fehlen. Laminin ist ein großes Glycoprotein, das als Heterotrimer aus α -, β - und γ -Untereinheiten besteht. Diese drei Polypeptidketten sind kreuzförmig zusammengesetzt und binden an Kollagen IV, Proteoglycan und viele Rezeptoren der Zellmembran verschiedener Zellen, besonders Epithelzellen (Timpl and Brown, 1994).

Diese beiden Netzwerke werden durch die Interaktion von Nidogen-Brücken verknüpft und bilden so ein Gerüst für weitere Bestandteile wie Perlecan, Fibronectin und andere Glycoproteine (Aumailley et al., 1993).

Nidogen ist ein stabförmiges Protein, das aus einer einzigen Polypeptidkette besteht und kommt in zwei Isoformen vor: Nidogen 1 und Nidogen 2. Es besitzt zwei globuläre Domänen an den Enden und eine zentral in der Mitte. Da Nidogen mit hoher Affinität Kollagen IV und Laminin bindet, spricht man ihm eine organisatorische Beteiligung beim Zusammenbau der Basallamina zu. Es wird von mesenchymalen Zellen produziert, während Laminin von epithelialen Zellen synthetisiert wird (Mokkapati et al., 2008, Timpl et al., 1983).

Perlecan ist ein großes Proteoglycan, dessen Kern aus fünf Domänen besteht und ist mit seinen Glycosaminoglykan-Seitenketten verantwortlich für die negative Gesamtladung der Basalmembran (Iozzo, 2005, Iozzo et al., 1994). Es wird hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert, die an die Basalmembran angrenzen und bindet an Fibronectin, Nidogen und Laminin. Zu seinem strukturgebenden Beitrag zur Basallamina interagiert es stark mit Wachstumsfaktoren wie b-FGF und TGF- β (Garant, 2003).

Fibronectin ist ein extrazelluläres Glycoprotein, das viele Bindungsstellen besitzt, unter anderem für Integrine und verschiedene andere Moleküle der ECM. Seine dimere Struktur setzt sich aus zwei gleichen Polypeptidketten zusammen, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die Interaktion von Zellen mit Fibronectin ist wichtig für deren Stabilisation und Migration. Zudem spielt Fibronectin in der Wundheilung eine große Rolle (Garant, 2003). Fibronectin-Filamente, die im subepithelialen Bindegewebe angeordnet sind, binden Kollagen VII und beteiligen sich auf diese Weise an der Bindung mit der Basalmembran (Lapiere et al., 1994).

Integrine dienen als molekulare Brücken zwischen den Proteinen des Zytoskeletts und der ECM. Sie stellen Zelloberflächenrezeptoren der Plasmamembran basaler Zellen für zahlreiche ECM-Komponenten oder Zelloberflächenproteine anderer Zellen dar und sorgen für eine stabile Anhaftung der basalen Zellen an die ECM. Integrine gehören zu einer Familie von Transmembranproteinen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Sie sind Heterodimere und setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen, wobei mindestens 14 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt sind (Garant, 2003). Einige Integrine binden mehr als einen Liganden der ECM. Umgekehrt binden individuelle Matrixproteine an verschiedene Integrine (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Auf diese Weise kommunizieren Zellen auf chemischem Weg bidirektional mit ihrer Umwelt. Besonders die Bindungen der Integrine mit Laminin 5 und Fibronectin führen zu Ankerpunkten zwischen der ECM und dem Netzwerk der Aktin-Mikrofilamente. Intrazelluläre Adhäsion der basalen Keratinozyten wird durch Cadherine oder durch direkte Verbindung verschiedener Integrin-Rezeptoren vermittelt. Die Verbindung von bestimmten Integrinen mit Laminin 5 in Hemidesmosomen verankert Zytokeratin-Filamente über Kollagen VII mit dem darunter liegenden Bindegewebe. Laminin 5 spielt auch eine wichtige Rolle beim Zusammenbau der Hemidesmosomen (Baker et al., 1996). Des Weiteren aktivieren Integrine Signalwege über Tyrosinphosphorylierung. Interaktionen zwischen Integrinen und Laminin 1 an der basalen Zelloberfläche sind an der Regulierung der Zellpolarisation und der Zelldifferenzierung epithelialer Zellen beteiligt. Während der terminalen Differenzierung der Keratinozyten nimmt die Expression von β 1-Integrinen ab, die in epidermalen Stammzellen am größten ist (siehe Kapitel III. 1.2.1).

1.2.3 Lamina propria (Dermis)

Die Lamina propria ist eine Schicht aus lockerem Bindegewebe, die *in vivo* aus einem Netzwerk aus extrazellulärer Matrix besteht. In ihr ist eine dichte Fibroblastenpopulation enthalten. Sie ist direkt unterhalb des Epithels angelagert, mit der Basalmembran verankert und kann ins Stratum papillare (Papillarschicht) und ins Stratum reticulare (Netzschicht/Geflechschicht) aufgeteilt werden (Abbildung 2). In der Papillarschicht erstecken sich fingerartige Einstülpungen (sog. Retezapfen) des Epithels in das Bindegewebe. Die Länge der Papillen variiert, je nach Ort und funktionellem Bedarf. In Regionen mit hoher mechanischer Belastung, wie der mastikatorischen Schleimhaut, steigt die Anzahl und Länge der Papillen, während in der auskleidenden Schleimhaut die Netzschicht oder subpapillare Schicht dominiert (Avery, 1994). Zudem wird durch diese strukturelle Beschaffenheit die Berührungsfläche zwischen Dermis und Epidermis vergrößert, was die Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen aus den Blutgefäßen der Dermis verbessert.

Beide Schichten der Lamina propria enthalten ein dichtes Netzwerk aus Kollagen I und III, die mit langkettigen Kohlenhydraten angereichert sind. Besonders die wasserbindenden Glykosamioklycane wie Hyaluronsäure, Heparansulfat, Dermatansulfat, Chondroitinsulfat und Keratansulfat sind in großen Mengen vorhanden. Sie binden an Proteoglycane und sind somit an der Bildung riesiger Proteoglycan-Aggregate beteiligt. Weitere faserige Bestandteile sind elastische Fasern, die aus den Proteinen Fibrillin und Elastin aufgebaut sind.

In der Lamina propria sind ebenso vaskuläre Komponenten sowie Lymphgefäße, Nerven und Kanäle von Speicheldrüsen zu finden (Scheller et al., 2009), deren Acini gewöhnlich in den tieferen Schichten der Submukosa zu finden sind. Vereinzelt kommen auch Abwehrzellen wie Makrophagen, Plasma-Zellen, Mastzellen und Lymphozyten vor (Moharamzadeh et al., 2007).

Die Blutversorgung erfolgt über ein tief liegendes Gefäßnetzwerk aus der Submukosa, das in ein sekundäres Netzwerk in der Papillarschicht der Lamina propria ausläuft und mit Kapillarschlingen in den Papillen der Dermis endet (Avery, 1994). Von diesem werden die Ernährung und der Stoffwechsel der gefäßlosen Epidermis gewährleistet.

In vielen Bereichen des Mundes schließt sich die Lamina Propria an lockeres Bindegewebe der Submukosa mit Blut-, Lymphgefäßen und Nerven an (Moharamzadeh et al., 2007).

Dermal-epidermale Interaktionen

Für die Wichtigkeit von dermal-epidermalen Interaktionen in der Embryonalentwicklung gibt es zahlreiche Beispiele, wie z. B. die Zahnentwicklung (Garant, 2003). Interaktionen zwischen mesenchymalen Zellen (Fibroblasten der Dermis) und Epithelzellen spielen aber ebenso beim epidermalen Wachstum und der Differenzierung eine Rolle und regulieren die Homöostase (Maas-Szabowski et al., 1999). An diesem gegenseitigen Austausch von Informationen sind sowohl Proteine der Zelloberfläche über Zell/Matrix und Zell/Zell Kontakte als auch lösliche Faktoren beteiligt, die meist das Ergebnis regulierter Transkription sind (Szabowski et al., 2000). Schon Rheinwald und Green zeigten 1975, dass Fibroblasten zur Kultur von Keratinozyten benötigt werden und vermuteten eine parakrine Stimulation der Keratinozyten durch mesenchymale Zellen. *In vivo* lassen sich daran beteiligte Faktoren nur schwer untersuchen. So wurde versucht dermal-epidermalen Interaktionen in *in vitro* Kokultur-Modellen auf die Spur zu kommen (Horch et al., 2001, Mackenzie and Binnie, 1983, Rheinwald and Green, 1975, Smola et al., 1998). Stark et al. zeigten 2004, dass bei einer Kultur von Keratinozyten ohne Fibroblasten keine Komponenten der Basallamina auffindbar waren, mit Ausnahme des Laminin 5. Bei einer Kultur von beiden Zellarten zusammen waren jedoch alle Komponenten der Basallamina vorhanden und reicherten sich mit der Kulturzeit an (Horch et al., 2001). Maas-Szabowski et al. deckte 1999 einen doppelt parakrinen Mechanismus zwischen Keratinozyten und Fibroblasten auf (Abbildung 10) (Maas-Szabowski et al., 1999). Das von Keratinozyten stammende Zytokin IL-1 (Interleukin 1) induziert dabei die Bildung von KGF („*Keratinocyte Growth Factor*“) in Fibroblasten. Dieser Faktor stimuliert wiederum die Proliferation von Keratinozyten. Genauere Details dieses Mechanismus konnten durch die Verwendung muriner „*knock out*“ Fibroblasten geklärt werden (Szabowski et al., 2000). Diesen Fibroblasten fehlten die Komponenten c-Jun oder JunB des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein 1), der maßgeblich an der Regulation der Proliferation und Differenzierung beteiligt ist. Es zeigte sich, dass JunB defiziente Fibroblasten eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung verursachten, während c-Jun defiziente Fibroblasten das Keratinozytenwachstum nicht unterstützten. Analysen konnten die antagonistische Regulation von KGF und GM-CSF („*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*“) als Zielgene von AP-1 in Fibroblasten durch c-Jun und JunB bestätigen, wobei c-Jun als Aktivator und JunB als Repressor der Transkription fungiert.

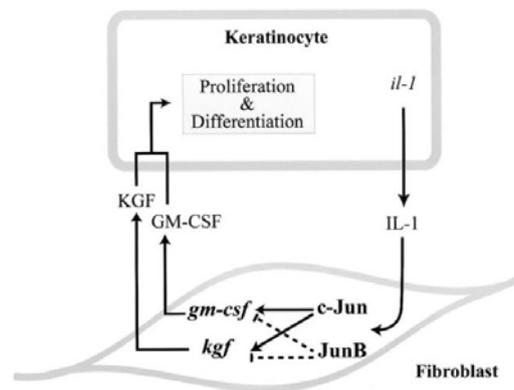


Abbildung 10:
IL-1 abhängige dermal-epidermale Interaktionen
(Szabowski et al., 2000)

Florin et al. entdeckten 2005 weitere JUN-regulierte Faktoren, PTN (Pleiotrophin) und SDF-1 („*Cell-derived factor 1*“), die IL-1 unabhängig sind. Diese beiden Zytokine werden *in vivo* von dermalen Fibroblasten exprimiert und üben einen mitogenen Effekt auf primäre humane Keratinozyten aus. Die Ko-Kultivierung von Fibroblasten und Keratinozyten zeigte eine Stimulation der PTN-Expression während die SDF-1-Produktion gehemmt wurde (Florin et al., 2005).

Auch Wachstumsfaktoren wie TGF- β („*Transforming Growth Factor beta*“) oder KGF beeinflussen dermale und epidermale Zellen gegenseitig (Ansel et al., 1993, Arkonac et al., 1998). Der von Keratinozyten exprimierte Wachstumsfaktor PDGF („*Platelet-derived Growth Factor*“) wirkt zum Beispiel mitogen auf mesenchymale Zellen wie Fibroblasten und Zellen des weichen Muskels und erhöht deren Migration. Zudem stimuliert er die Fibroblasten in der Zellkultur zur Produktion größerer Mengen ECM (Ansel et al., 1993).

1.2.4 Submukosa

In den meisten Regionen des Mundes fehlt die Submukosa oder dient lediglich zur Anhaftung der Lamina propria an den darunter liegenden Knochen oder Skelettmuskel. In dreischichtigen Regionen wie im Bereich der Wangen, Lippen oder Teilen des Gaumens folgt unter der Lamina propria dagegen eine bindegewebige Submukosa, in die kleine Speicheldrüsen eingelagert sind (Lüllmann-Rauch, 2003). Sie dient als Bindeglied zwischen der Mundschleimhaut und dem darunterliegenden Körpergewebe. Im Aufbau besteht sie aus faserigem Bindegewebe, das mit Fettgewebe durchsetzt ist (Abbildung 2). Dabei bestimmt die Anzahl der Bindegewebsfasern, ob eine lockere Verbindung (wenig Fasern) und somit eine starke Hautverschieblichkeit möglich ist oder ob die Verbindung sehr straff ist (viele Fasern) und damit nicht verschieblich. Das Fettgewebe ist kammerartig in das Bindegewebe der Unterhaut eingelagert. Es dient nicht nur zur Aufnahme von überschüssigem Fett sondern auch als Polstergewebe, wie es z. B. beim Wangenfettpfropf im Mundwinkelbereich vorkommt. Des Weiteren wird es als Energielieferant für die körpereigene Wärmeproduktion benötigt (Gührung and Barth, 1992). Die Submukosa ist durchzogen von vielen großen Blutgefäßen, Nerven und lymphatischen Gefäßen, die Ernährungs- und Schutzfunktion übernehmen (Avery, 1994).

2. Tissue Engineering

Unter *Tissue Engineering* wird die künstliche (*in vitro*-) Herstellung von Gewebe verstanden. Auf der Konferenz der National Science Foundation 1988 wurde es wie folgt definiert (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.“)

Dieses noch relativ junge Wissenschaftsgebiet hat sich in den letzten 20 - 30 Jahren entwickelt und erfordert ein Zusammenwirken verschiedener Disziplinen aus Biologie (vor allem der Molekular- und Zellbiologie), Biotechnologie, Chemie, Materialwissenschaften und Medizin (Abbildung 11).

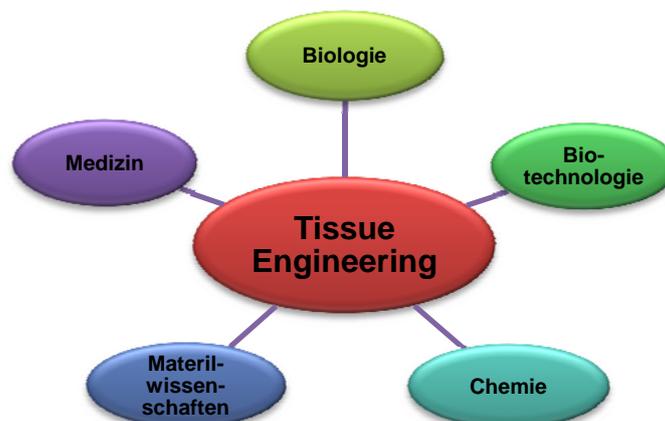


Abbildung 11:
Interdisziplinarität des Tissue Engineering

2.1 Methode

Beim *Tissue Engineering* werden Patienten Körperzellen entnommen, diese isoliert, *in vitro* gezüchtet und nach erfolgter Vermehrung dem Patienten als autologes, bioartifizielles Gewebe wieder reimplantiert (Abbildung 12).

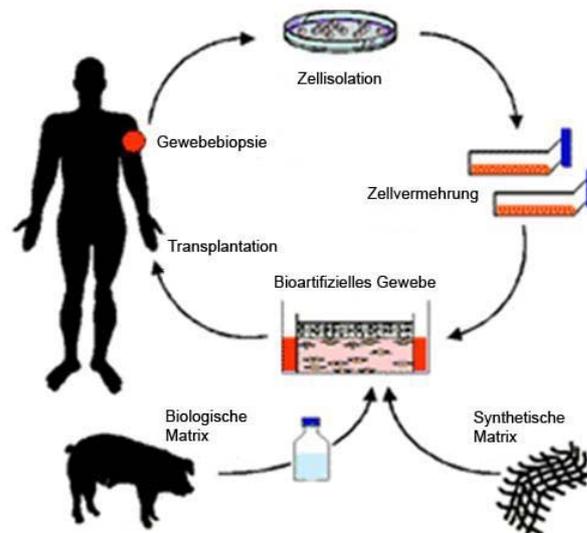


Abbildung 12:
Prinzip des Tissue Engineering
[<http://www.bioartificial-organs.net/de/home/tissue-engineering.html>]

Die Neubildung von Gewebe beruht auf drei Grundelementen, die das sog. trianguläre Konzept bilden (Schmidt-Rohlfing et al., 2009): ein strukturelles Gerüst, Zellen und Medien mit geeigneten Zusätzen, wie z. B. Wachstumsfaktoren (Abbildung 13).

Zur Vermehrung der Zellen und der späteren Transplantation ist der Einsatz eines Trägermaterials (Matrix) nötig, in oder auf dem die Zellen wachsen können. Hier kommen entweder xenogene, allogene oder alloplastische Matrices zum Einsatz, die ein 3D-Gerüst für die Zellen bieten. Dieses sollte in angemessener Zeit resorbierbar sein. So ist der Patient nicht langfristig auf künstliche Materialien oder Transplantate von anderen Menschen angewiesen. Als Matrix kommen unter anderem Hydrogele wie z. B. Alginate, Fibrin, Hyaluronsäure oder Chitosan (Hunt et al., 2009, Stark et al., 2004, Sun et al., 2006, Yang et al., 2010) sowie Biopolymere wie Polyglykolsäure (PGA), Poly-L-Laktidsäure (PLLA), Polylactid-co-Glycolid (PLGA), Poly (ϵ -Caprolacton) (PCL), aber auch natürliche Stoffe wie Kollagen tierischen Ursprungs, mineralische Träger aus Kalziumphosphaten oder die Kombination verschiedener Materialien zum Einsatz (Horch et al., 2000, Terada et al., 2000,

Weir and Xu, 2010, Zein et al., 2002). Als allogener Zellträger wird bereits AlloDerm® (LifeCell Corporation), eine azellularisierte Dermis aus humanem Spendergewebe verwendet (Schonmeyr et al., 2009, Izumi et al., 1999). Physiologischerweise übernimmt die extrazelluläre Matrix (ECM) diese Funktion. Da autologe Zellen verwendet werden, können Abstoßungsreaktionen des Körpers vermieden werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die natürliche Differenzierung der Zellen erhalten bleibt, denn nur so kann das neue Gewebe seine Funktion auch korrekt erfüllen. Dies ist durch den Einsatz von Medien mit bestimmten Wachstumsfaktoren oder günstige Kulturbedingungen möglich.



Abbildung 13:
Trianguläres Konzept des Tissue Engineering

2.2 Anwendungsgebiete

Wichtige Forschungsfelder im Bereich des *Tissue Engineering* zur klinischen Rekonstruktion sind die Herstellung von Hautersatz sowie Knochen- oder Knorpelkonstrukten. Beim Hautersatz findet bereits eine klinische Anwendung statt, zum Beispiel zur Behandlung von Patienten, deren Gesicht und Körper durch Unfall entstellt ist, bei Schwerstbrandverletzten oder für schwer heilende Wunden, z. B. diabetische Ulcera (Kasper, 2005). Knochen, Knorpel und Tracheaimplantate wurden bereits klinisch am Menschen getestet (Gikas et al., 2009, Macchiarini et al., 2004, Marcacci et al., 2007). Dabei handelt es sich meist um Verlaufsbeobachtungen und individuelle Heilversuche mit geringen Fallzahlen, die gute Ergebnisse erzielten. Toxikologische und mikrobiologische Untersuchungen sind jedoch für reproduzierbare, verlässliche Behandlungsmethoden unverzichtbar (Schmidt-Rohlfing et al., 2009).

Ein weiteres Arbeitsfeld ist die Züchtung von Herzklappen, Blutgefäßen, Dünndarm oder Blase (Schultheiss et al., 2005, Terada et al., 2000). Organe wie die Leber oder Niere sind aufgrund ihres diffizilen Aufbaus schwieriger herzustellen und befinden sich noch in der experimentellen Phase (Minuth et al., 2004, Ogawa et al., 2004, Terada et al., 2000).

Im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bieten sich beim *Tissue Engineering* u. a. Anwendungsgebiete bei der Knochenregeneration (Kiefer- und Gesichtsknochen), beim Weichgewebersatz (Mundschleimhaut, Nerven) sowie bei der parodontalen Regeneration (Zahnhalteapparat) an (Lynch et al., 1999).

Das *Tissue Engineering* kommt jedoch nicht nur bei der Entwicklung von Transplantaten für die klinische Anwendung zum Einsatz. Gewebekonstrukte werden auch als *in vitro* Modell zum Test verschiedener Substanzen wie Kosmetika oder Medikamente zur Vermeidung von Tierversuchen eingesetzt (Moharamzadeh et al., 2009). Diese Entwicklung ist sehr wichtig für die Kosmetikindustrie, da die 7. EG-Kosmetik-Richtlinie vorschreibt, bis zum Jahr 2009 Tierversuche zur kutanen Resorption durch *in vitro*-Tests zu ersetzen (Mertsching et al., 2009).

In der Grundlagenforschung werden molekulare sowie zellbiologische Vorgänge an diesen Modellen untersucht.

3. Tissue Engineering von Haut und Oralmukosa, Stand der Forschung

Die Verfügbarkeit von Haut und Mundschleimhaut ist essentiell für die ästhetische Rekonstruktion nach Traumen, chirurgischen Eingriffen sowie schweren Brandwunden (Scheller et al., 2009).

Die erste Beschreibung einer Hauttransplantation ist bereits über 2500 Jahre alt. Es ist überliefert, dass in Indien schon zur Zeit Buddhas freie Hautverpflanzungen zur Rekonstruktion von amputierten Nasen, als Folge rechtlicher Bestrafung, von der „*Tilemaker-Cast*“ durchgeführt wurden (Georg, 1965, Hauben et al., 1982).

Die ersten Versuche geschädigte Haut und Schleimhaut mit einem gezüchteten Gewebe zur Behandlung von Brandwunden oder für intra-orale Transplantationen zu ersetzen erfolgte nicht vor 1980 (Lauer and Schimming, 2001, Madden et al., 1986).

Ein Konstrukt aus Epidermis und Dermis (Haut aus zwei Komponenten) war das erste von der FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) zugelassene, mittels *Tissue Engineering* hergestellte Transplantat, das in der klinischen Praxis eingesetzt wurde (Scheller et al., 2009). Die Zellen dieses Transplantates stammten von neonataler Vorhaut, da diese ein gutes Proliferationspotential besitzen.

Ein idealer gezüchteter Mundschleimhautersatz jedoch basiert auf der Reproduktion eines physiologisch korrekten Gewebes in allen Schichten („*full thickness*“). Diese Schleimhaut benötigt drei verschiedene Schichten: die Lamina Propria, die Basalmembran und ein mehrschichtiges Plattenepithel.

Neben der klinischen Anwendung zeigen verschiedene Studien die Entwicklung von Mundschleimhautkonstrukten auch als *in vitro* Modell zum Test (zahn)medizinischer Materialien (Moharamzadeh et al., 2008b, Mostefaoui et al., 2002). Diese *in vitro* Modelle scheinen vielversprechend für die Beurteilung der Schleimhaut-Toxizität neuer Substanzen zu sein, da sie die klinische Situation besser als einschichtige Zellkultur-Testsysteme widerspiegeln. Sie erlauben die Untersuchung von multiplen Antworten der Mukosa auf unterschiedliche Reize. So sind auch Studien über Krankheitsverläufe oder bakterielle Infektionen der oralen Mukosa möglich. Auf diese Weise kann der Einsatz von Tierversuchen reduziert werden.

Dabei ist die gezüchtete Mundschleimhaut je nach Verwendungszweck unterschiedlich aufzubauen. Während ein *in vitro* Test Modell lange Zeit stabil sein muss, sollte ein Konstrukt für die klinische Anwendung *in vivo* biologisch abbaubar sein, um eine dauerhafte Fremdkörperreaktion zu vermeiden. Trotzdem sollte es widerstandsfähig gegen die natürlichen Scherkräfte in der Mundhöhle sein. Bei Testsystemen können auch

immortalisierte oder durch Viren transformierte Zellen zum Einsatz kommen, was bei einer klinischen Anwendung ausgeschlossen ist (Moharamzadeh et al., 2007).

3.1 Deckung von Epitheldefekten mit autologen Keratinozyten

Die Etablierung von Primärkulturen humaner Fibroblasten und Keratinozyten der Haut oder der oralen Mukosa ist eine Grundvoraussetzung für die Herstellung von Dermal-Äquivalenten bzw. von organotypischen Kokulturen *in vitro*. Pionierarbeit leisteten dazu Rheinwald und Green 1975, die eine Methode zur Primärkultivierung von Keratinozyten entwickelten. Sie setzten dazu postmitotische „Feeder“- (Nähr-) Fibroblasten ein und erreichten durch die Kokultivierung mit Keratinozyten die Proliferation der Epidermiszellen (Rheinwald and Green, 1975). In den folgenden Jahren konnte diese Methode durch den Einsatz von Mediumsupplementen wie EGF, Insulin und Cholera-toxin optimiert werden (Rheinwald and Green, 1977). Mit modernen Keratinozyten-Medien ist die Verwendung von „Feeder“-Fibroblasten überflüssig geworden, da alle nötigen Wachstumsfaktoren und Nährstoffe enthalten sind.

Als nächster Schritt folgte die Entwicklung von autologen epidermalen Äquivalenten (CEA: „cultured epidermal autografts“) aus Keratinozyten-Monolayern oder stratifizierten Multilayern, die ohne Matrix bereits bei menschlichen Patienten zur Deckung von Verbrennungs- und chronischen Wunden verwendet wurden (Limat et al., 1996, O`Connor et al., 1981). Darüber hinaus wurden sie bereits in klinischen Studien zur oralen Defektdeckung eingesetzt (Tsai et al., 1997). Diese Keratinozyten-„Sheets“ zeigten jedoch einige Limitierungen. Neben dem hohen Infektionsrisiko war die Handhabung der fragilen Transplantate sehr anspruchsvoll. Die Angeheerlag lag lediglich bei 55 - 60 % (Pandya et al., 1998). Weitere klinische Untersuchungen (Gath and Raguse, 2001) verwenden zur intraoralen Defektdeckung das kommerziell erhältliche Dermagraft® (neonatale Fibroblasten in einer resorbierbaren Polyglactin-Matrix) ohne Keratinozyten bzw. TissueFoil E® (equines Kollagen I) als Träger-Matrix für subkultivierte Mukosa-Keratinozyten als alleiniges Ersatzmaterial (Sauerbier et al., 2006). Auch das Mukosa-Äquivalent EVPOME, das aus azellularisierter Leichenhaut besteht (Alloderm®), die mit Keratinozyten besiedelt wurde, kam bereits in klinischen Versuchen zum Einsatz (Izumi et al., 2003).

Ein genereller Nachteil bei dieser Vorgehensweise war die sehr unsichere und variable Einheilung der Transplantate. Dies hatte einen frühen Transplantatverlust, Blasenbildung und Vernarbung zur Folge (Clugston et al., 1991, Cooper et al., 1993). Diese Probleme waren auf das Fehlen einer dermalen Komponente in diesen Transplantaten zurückzuführen (Woodley et al., 1988b).

3.2 Möglichkeiten und Grenzen kombinierter Transplantate, Kokulturen aus Fibroblasten und Keratinozyten

Aus diesem Grunde wurde daher versucht, kombinierte Transplantate, sogenannte „*composite grafts*“ von Kokulturen aus Keratinozyten und Fibroblasten auf einer Matrix als Trägersubstanz zu züchten.

In zahlreichen Untersuchungen wurden diese dermal-epidermalen Substitute in der *in vitro* Kultur (Contard et al., 1993), im Tierversuch (Butler et al., 1998) und im klinischen Einsatz meist zur Defektdeckung von Brandwunden und von chronischen Ulzera eingesetzt. Dabei wurden synthetische und biologische, biodegradierbare Matrices wie z.B. Kollagen-Glycosaminoglycan-Membranen, Hydrogele (meist aus Kollagen I), Polyglycolsäure-Netze oder azelluläre allogene bzw. xenogene Dermis-Strukturen eingesetzt. Im Bereich des mukosalen Gewebersatzes mit „*composite grafts*“ für intraorale Defekte existieren derzeit nur wenige *in vitro* Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen (Odioso et al., 1995). In diesen Untersuchungen wurden als Träger-Matrices für autologe Zellen Gele aus Kollagen I und III, Kollagen I oder resorbierbare Nylonnetze verwendet. Dazu bringt man zunächst orale Fibroblasten des Bindegewebes auf die Matrix auf, die in diese migrieren und dort proliferieren. In einem zweiten Schritt kommt es zur Aussaat von oralen Keratinozyten auf die Oberfläche des Trägers. Diese bilden zunächst eine einzellige Schicht, die jedoch mittels bestimmter Medien und Kulturbedingungen ein stratifiziertes mehrschichtiges Epithel ausbilden kann. Neuere Studien zeigen nicht nur ein physiologisches Differenzierungsverhalten, sondern außerdem eine verminderte Wundkontraktion bei einem kombinierten Zellverband aus Fibroblasten und Keratinozyten. Dabei spielen die in Kapitel III. 1.2.3 erwähnten dermal-epidermalen Interaktionen über Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren und Zytokine eine große Rolle.

Auch die Kultivierung von epidermalen Zellen an der Luft-Medium-Grenze (ALI: „Air Liquid Interface“) vereinfacht die Konstruktion von mehrschichtigem Epithel, das histologische Ähnlichkeit mit dem Originalgewebe aufweist (el Ghalbzouri et al., 2002, Rosdy and Clauss, 1990, Rosdy et al., 1993). Nach dieser Methode hergestelltes Gewebe zeigt nicht nur die Bildung einer Basalmembran, sondern auch die Expression von Differenzierungsmarkern wie verschiedenen Cytokeratinen oder die Synthese von Hüll- und Strukturproteinen (Moharamzadeh et al., 2007, Rosdy and Clauss, 1990, Rosdy et al., 1993).

Inzwischen werden verschiedene Modelle des Hautersatzes zum klinischen Einsatz kommerziell produziert. Dermagraft[®], das aus allogenen Fibroblasten, ECM und einem Polyglactin-Träger besteht, wird z. B. zur vorläufigen Wundbehandlung bei Brandwunden eingesetzt, bevor es durch autologe Hauttransplantate ersetzt werden kann (Purdue, 1997). Apligraf[®] und OrCel[®], beides zweischichtige humane Hautäquivalente aus Keratinozyten und

Fibroblasten in einer Kollagen-Matrix, sind bei der Behandlung von venösen Geschwüren und akuten sowie chronischen Wunden erfolgreich (Supp and Boyce, 2005).

Im Gegensatz dazu wurde gezüchtete Mundschleimhaut als „*composite graft*“ bisher nicht für den klinischen Einsatz kommerzialisiert.

Trotz einer im „*composite graft*“ möglichen Interaktion von Fibroblasten und Keratinozyten erscheint der Mangel an Blutgefäßen im herzustellenden oralen Ersatzgewebe problematisch. Sie stellen nicht nur Nährstoffe zur Aufrechterhaltung der Zellstruktur zur Verfügung, sondern sind an der Neubildung von Gewebe beteiligt. Daher ist es denkbar, dass zukünftige „*composite grafts*“ als dritte Komponente vaskuläre Endothelzellen und/oder endotheliale Progenitorzellen (EPCs) enthalten, da diese die Wundheilung bzw. das Keratinozytenwachstum positiv beeinflussen (Capla et al., 2006) und so einer möglichen Vernarbung bei der Einheilung des Transplantates vorbeugen.

3.3 Klinische Bedeutung

Der Gewebeersatz zur Deckung intraoraler Defekte ist in der chirurgischen Therapie insbesondere von Tumorpatienten von zentraler Bedeutung für den Erhalt von Funktion und Ästhetik. Bisherige Methoden der Defektdeckung nach Resektion kleiner Tumoren (T1-2 nach TNM-Klassifikation) mit autologen, freien Spalt- und Vollhaut-Transplantaten zeigen neben der Morbidität des extraoralen Spenderareals verschiedene andere Nachteile wie unsichere Angehrate, Vernarbungstendenz mit ästhetischen bzw. kaufunktionellen Einschränkungen und Persistenz des ursprünglichen Phänotyps im mukosalen Milieu der Mundhöhle. Die meisten dieser Nachteile können mit Hilfe von im *Tissue Engineering*-Verfahren hergestellten autologen Mukosa-Transplantaten umgangen werden.

Das seit Mai 2001 kommerziell erhältliche autologe Mundschleimhaut-Transplantat BioSeed[®]-M (BioTissue Technologies AG, Freiburg) zum intraoralen Mukosaersatz besteht aus autologen, subkultivierten Mundschleimhaut-Keratinozyten (2 - 3-schichtiger Zellverband), die auf eine Trägerfolie (equine Kollagenfolie, TissueFoil E[®], Baxter GmbH) aufgebracht und direkt auf den vorliegenden Schleimhautdefekt transplantiert wird.

Da es sich hier nicht um ein zusammengesetztes Transplantat handelt, liegen die Grenzen dieses kommerziell erhältlichen Konstruktes in fehlenden dermal-epidermalen Interaktionen während der *in vitro*-Kultur, einem frühen Transplantatverlust sowie Blasenbildung und Vernarbung des Mukosa-Transplantates aufgrund der fehlenden mesenchymalen Komponente (Lauer and Schimming, 2001, Woodley et al., 1988a).

Solche Nachteile können durch Kokulturen von Keratinozyten der oralen Mukosa und oralen Bindegewebs-Fibroblasten in einer Träger-Matrix (Dermal-Äquivalent) unter der Perspektive einer *in vivo*-Transplantation vermieden werden.

4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es grundlegende Kenntnisse über primäre humane Mundschleimhautzellen in Zellkultur allein und in Ko-Kultur mit Fibroblasten auf verschiedenen Biopolymer-Scaffolds zu gewinnen, um im Bereich oraler Gewebe das Prinzip des "Tissue Engineerings" einzusetzen. Mit Hilfe dieses Verfahrens soll ein möglichst gewebeahes Konstrukt aus einer biologischen Matrix mit *in vitro* kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten der Oralmukosa zum klinischen Einsatz hergestellt werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war im Einzelnen:

I. Die Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von humanen oralen Fibroblasten und Keratinozyten.

II. Die Untersuchung verschiedener klinisch einsetzbarer biologischer Matrices auf Eignung als Scaffold für das *Tissue Engineering* von Oralmukosa.

III. Die Entwicklung von Dermal-Äquivalenten (Fibroblasten aus Scaffolds) (Abbildung 14 a) und Oralmukosa-Äquivalenten (Keratinozyten auf Dermal-Äquivalenten) (Abbildung 14 b) der isolierten Zellen auf den ausgewählten Scaffolds *in vitro*.

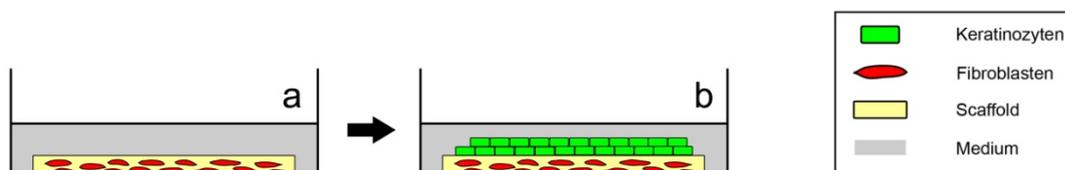


Abbildung 14:

(a) Modell eines Konstruktes aus einer Matrix mit kultivierten Fibroblasten (Dermal-Äquivalent, DÄ)

(b) Modell eines Konstruktes aus einer Matrix mit kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten

(Oralmukosa- Äquivalent, OMÄ)

IV. Untersuchung der Mundschleimhaut-Transplantate auf Bildung von extrazellulärer Matrix und Differenzierungsstatus der Epithelzellen mittels Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie und RT-qPCR.

IV. Material

1. Geräte

Folgende Geräte wurden für diese Arbeit verwendet:

Absaugpumpe	KNF Neuberger
Analysenwaage	Kern, ABS
Brutschrank	Heraeus Hera Cell
CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System Modell TTC	Schärfe Systeme, Reutlingen
Elektronenmikroskop	Digital Scanning Microscope DSM 940, Zeiss
Elektrophoresesystem	Biometra, Compact M
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiolab, HBO 50/AC
Kamera mit Mikroskopieaufsatz	Leica, Digital-Kamera EC3
Kühlzentrifuge	Hettich, Universal 320R
Kryostat	Microm, HM500 OM SLEE, Kryostat Typ MNT
Lichtmikroskop	Olympus CK40, Leitz DM RBE
LightCycler 1.5	Roche
Magnetrührer	Heidolph MR 3001
Nanodrop Spectrophotometer ND-2000c	Peqlab
PCR-Thermocycler	Biorad, iCycler
pH-Meter	WTW, Inolab
Photometer	Tecan, Rainbow
Pipetten	Eppendorf 10, 20, 100, 200, 1000 Eppendorf Multipette plus
Pipettierhilfe	Brand, Accu-Jet
Präzisionswaage	Kern, KB
Power Supply	Invitrogen
Schütteltisch	Mini Rocker MR-1
Sterile Werkbank	Heraeus, Hera Safe
Thermoblock	Eppendorf, Thermomixer 5436
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge Pico

Tischzentrifuge	Labnet, Spektrafuge Mini
UV-Transilluminator	Biometra, BioDocAnalyse
Vortexgerät	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Wasserbad	Julabo, GFL
Zellzählgerät	Schärfe System, CASY

2. Chemikalien, Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Acris, Abcam, BD Bioscience, C-C-Pro, Chemicon, Dako, Dianova, Gibco BRL, Invitrogen, Macherey-Nagel, Mo Bi Tec, Merck, Millipore, Sigma, PAN, Peqlab, Promega, Promocell, Roche und Roth bezogen.

3. Patienten und Untersuchungsmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mundschleimhautproben für Zellkulturzwecke verwendet. Diese wurden im Rahmen von Routineoperationen nach schriftlicher Zustimmung der Patienten in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg im Zeitraum von Oktober 2007 bis September 2010 entnommen. Die Spender waren im Alter von 15-89 Jahren. Der Altersdurchschnitt betrug 35 Jahre. Mit der Isolation von Zellen wurde sofort nach der Entnahme begonnen.

4. Nährmedien, Zusätze und Puffer für die Zellkultur

4.1 Medien

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)

Dem fertigen Flüssigmedium (GIBCO, Invitrogen) wurden 10 % FCS und 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 0,1 % Fungizone-Lösung zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Dulbecco's Modified Eagles Medium mit Gerinnungsfaktor 12 (DMEM / HAM'S F-12)

Dem fertigen Flüssigmedium (GIBCO, Invitrogen) wurden 10 % FCS, 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 0,1 % Fungizone-Lösung zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Green's Medium

Dieses Medium bestand aus einer 1:1 Mischung von DMEM und DMEM/HAM'S F-12 (GIBCO, Invitrogen), der neben 10 % FCS, 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 0,1 % Fungizone-Lösung weitere Zusätze hinzugefügt wurden:

10 ng/ml EGF, 0,4 µg/ml Hydrocortison, 10^{-4} mol/l Adenin, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin und 2×10^{-7} mol/l Triiodothyronin. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM)

Dem Medium (Promocell) wurde vor Verwendung der auf - 20 °C gelagerte „Supplement Mix“, 60 µl 0,5 M CaCl₂ und 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung zugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die Konzentration der Wachstumsfaktoren im fertigen Medium betrug:

Tabelle 1: Konzentration der Wachstumsfaktoren im KGM

Bovine Pituitary Extract	0,4 % (v/v)
Epidermal Growth Factor, rec. human	0,125 ng/ml
Insulin, human	5 µg/ml
Hydrocortison	0,33 µg/ml
Transferrin, human	10 µg/ml
Epinephrine	0,39 µg/ml
CaCl ₂	0,15 mM

Endothelial Cell Growth Medium MV (ECGM MV)

Dem Medium (Promocell) wurde vor Verwendung der auf - 20 °C gelagerte „Supplement Mix“, 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 0,1 % Fungizone zugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die Konzentration der Wachstumsfaktoren im fertigen Medium betrug:

Tabelle 2: Konzentration der Wachstumsfaktoren im ECGM MV

ECGS/H	0,4 %
FCS	5 %
EGF	10 ng/ml
Hydrocortison	1 µg/ml

4.2 Medienzusätze

FCS

Fetales Kälberserum (PAN) wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Es wurde dem Nährmedium nach 30-minütiger Hitzeinaktivierung bei 56 °C in einer Konzentration von 10 % zugefügt.

Penicillin-/Streptomycin-Lösung

Die gebrauchsfertige, vom Hersteller (Invitrogen) steril filtrierte Antibiotikallösung enthielt 10 mg Streptomycin sowie 10.000 Units Penicillin je 100 ml und wurde dem Nährmedium in einer Konzentration von 1 % zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Fungizone-Lösung

Die gebrauchsfertige Lösung (Invitrogen) enthielt Amphotericin B in einer Konzentration von 250 µg/ml. Das Antimykotikum wurde dem Nährmedium in einer Konzentration von 0,1 % zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

4.3 Puffer und Lösungen

DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)

Gebrauchsfertiger Puffer (GIBCO, Invitrogen).

Tabelle 3: Zusammensetzung von DPBS

NaCl	137,93 mM
KCl	2,67 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	8,06 mM
CaCl ₂	0,901 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,493 mM

PBS⁻

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,5 mM	1,51 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	204,1 mg
KCl	2 mM	149,1 mg
NaCl	140 mM	8,18 g
<hr/>		
		ad 1000 ml H ₂ O _{dest.} pH auf 7,2 einstellen

PBS⁻/EDTA

Na-EDTA Salz	0,5 mM	186,1 mg
<hr/>		
		ad 1000 ml PBS ⁻ -Lösung pH auf 7,2 einstellen

Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin	5 g
EDTA-4Na	2 g
NaCl	8,5 g
<hr/>	
ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}	

Versene

1 ml Trypsin/EDTA auf 10 ml Versene

Alfazyme

Die gebrauchsfertige Lösung (Invitrogen) diente durch ihre proteolytische und kollagenolytische Aktivität zum Ablösen der Zellen bei der Passagierung von Zellkulturen. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

Trypsin

Die verwendete Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, 10-fach konzentriert, 0,5% Trypsin, 0,2% EDTA) wurde mit dest. H₂O 1:10 verdünnt, in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Das Reagenz wurde wie Alfazyme zum Ablösen von Zellschichten kultivierter Zellen verwendet.

Alle oben genannten Medien und Reagenzien wurden vor der Verwendung an Zellkulturen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Phosphatpuffer (PB), 0,2 M, pH 7,4

Puffer zur Herstellung der 0,1 M Gebrauchslösung, des 4 % PFA und der 18 % Succrose-Lösung für die histologischen Experimente.

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	28,8 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,2 g
NaCl	17,5 g
<hr/>	
	ad 1000 ml H ₂ O _{dest.} pH auf 7,4 einstellen

4 % PFA-Lösung in 0,1 M PB (pH 7,4):

4 g Paraformaldehyd wurden unter Erhitzen bis 80 °C in 40 ml dest. H₂O gelöst. Zur Klärung wurden einige Tropfen NaOH dazu gegeben. Nach Erkalten der Lösung wurde sie mit 50 ml 0,2 M PB (pH 7,4) verdünnt, gefiltriert und mit dest. H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

18 % Succrose-Lösung:

Zur Herstellung der 18 % Succrose-Lösung werden 36 g Succrose in 100 ml 0,2 M PB gelöst und mit dest. H₂O auf 200 ml aufgefüllt.

5. Zellträger

Tabelle 4: Verwendete Zellträger (Scaffolds)

Nr.	Membran	Bezugsquelle	Beschreibung
1	TissuFoil E (TFE)	Baxter GmbH, Unterschleißheim	equine, nativ strukturierte Kollagen I-Membran
2	Dermal Regeneration Template (DRT)	Integra NeuroSciences GmbH, Ratingen	spezifische, dreidimensionale Kollagen-Glukosaminoglycan- Matrix
3	Vicryl	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt	ungefärbte, gewebte, resorbierbare Membran aus Polyglactin 910
4	Small Intestinal Submucosa, (SIS) Azellularisierte Submucosa eines Schweinedünndarms	Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg (Prof. Dr. Heike Walles)	aus dem Dünndarm von Schweinen gewonnene, azellularisierte 3D-Membran, die aus Proteinen der extrazelluläre Matrix besteht
5	Polylaktid-Vlies (PLA-Vlies)	Universitätsklinikum Aachen (Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets)	Vlies aus Polylaktid
6	Alginat Membran	Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde Universitätsklinikum Würzburg	Membran aus Alginat
7	Hyalofill-F	ConvaTec GmbH, München	absorbierbares Faservlies aus Hyaluronsäureester (HYAFF®)

TissuFoil E (TFE)

Baxter GmbH

TissuFoil E ist eine native, equine Kollagen-Membran aus sterilem, hoch aufgereinigtem Kollagen I mit einer Dichte von 4 mg Kollagen/ cm³. Die Membran ist als chirurgischer Wundverband gedacht und für die Geweberegeneration vorgesehen. Sie wurde bereits für die Wiederherstellung von experimentellen Defekten der Bauchdecke verwendet (Schönleben et al., 2006), zur Behandlung von chronischen Geschwüren und als temporäre Auflage für Brandverletzungen. In der Oralmedizin wurde sie bereits bei Sinusbodenaugmentationen eingesetzt (Stricker et al., 2001).

Dermal Regeneration Template (DRT) Single Layer

Integra NeuroSciences GmbH

Die biologisch abbaubare DRT-„*single-layer*“ Membran ist eine mit einem Glycosaminoglycan (Chondroitin-6-Sulfat) quervernetzte, poröse Matrix aus Kollagen-Fasern boviner Sehnen. Sie hat eine kontrollierte Porösität sowie eine definierte Abbaurrate und dient als Fasergerüst zur Einwanderung von Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Kapillaren aus dem Wundbett. Auf diese Weise ermöglicht die Membran einen sofortigen Wundverschluss und eine permanente Regeneration von funktionalem, körpereigenem Dermisgewebe.

Die DRT-„*bilayer*“ Membran besitzt im Gegensatz zur „*single-layer*“ eine zusätzliche Silikonschicht, die vor Flüssigkeitsverlust schützt und als Schutzbarriere gegen Eindringen von Bakterien dient. Sie muss jedoch in einer weiteren Behandlung entfernt werden, nachdem sich eine Neodermis gebildet hat und durch Spalthaut oder ein epidermales autologes Transplantat ersetzt werden. Die DRT-„*bilayer*“ Membran wird häufig bei der Behandlung von tiefen Haut- und Brandwunden eingesetzt. Ihr Erfolg wurde in mehreren klinischen Studien bestätigt (Heimbach et al., 1988, Stern et al., 1990).

Vicryl

Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH

Die Vicryl-Membran besteht aus gewebten Polyglactin 910, einem Kopolymer aus Glycolid und Lactid. Seine Resorptionszeit beträgt 70 Tage. Das Gewebe ist als zellokklusive Barriere vorgesehen, um den Wund- und Organheilungsprozesses temporär zu unterstützen. Die Verwendung von Polyglactin 910 war nicht nur in Studien zur Behandlung von Bauchwandhernien erfolgreich (Bee et al., 2008, Robertson et al., 2003) sondern ermöglichte auch die Epithelialisierung von Wunden, die keine Keratinozyten-Migration unterstützten in Kombination mit Fibroblasten (Krejci-Papa et al., 1999).

Small Intestinal Submucosa (SIS):

Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg,
Prof. Dr. Heike Walles

SIS ist ein natürliches Biomaterial, das aus dem Dünndarm von Schweinen gewonnen wird. In speziellen mechanischen Verfahren wird das Gewebe von Zellen befreit. Das Endprodukt ist eine dreidimensionale, azelluläre extrazelluläre Matrix (ECM), die aus verschiedenen Proteinen wie Kollagen und anderen Biomolekülen wie Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glycoproteinen besteht. SIS wurde bereits als Scaffold für das *Tissue Engineering* verwendet, z. B. zur Rekonstruktion des Urogenitaltraktes (Cheng and Kropp, 2000, Zhang et al., 2000).

Polylaktid-Vlies (PLA-Vlies):

Universitätsklinikum Aachen, Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets

Zur Herstellung von PLA-Vliesen werden die Polymere am Institut für Textiltechnik der RWTH Aachen (ITA) ausgesponnen, texturiert und zu Stapelfasern konvertiert. Die Stapelfasern werden zunächst aufgelöst und anschließend der aerodynamischen Vliesproduktionsanlage für die Erzeugung von Vliesen ohne eine vorwiegende Faserorientierung oder der Laborkrempel für die Produktion von orientierten Vliesen zugeführt (Smeets et al., 2006).

Alginate Membran:

Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg

Drei Prozent Alginate (*Alginic acid sodium salt*, Sigma-Aldrich) werden sukzessiv in destilliertem Wasser gelöst. Durch Aufsprühen einer 1 M CaCl₂-Lösung bildet das Material die verwendete Membran aus.

Hyalofill-F:

ConvaTec GmbH

Hyalofill-F ist ein resorbierbares Faservlies aus HYAFF, einem Ester der Hyaluronsäure, die ein natürlicher Bestandteil der Extrazellulären Matrix (ECM) ist. Es wird als Wundauflage bei schwer heilenden Wunden verwendet und bildet in Verbindung mit dem Wundsekret ein hydrophiles Gel, das ein heilungsförderndes Wundmilieu schafft. Das Material hat eine starke Stimulation der Zellproliferation und Neoangiogenese zur Folge. Neben der Anwendung als Wundauflage wird es bereits von der italienischen Firma FIDIA Advanced Biopolymers als Trägermaterial für Hautzellen im *Tissue Engineering* zur Behandlung von dermalen- (Hyalograft 3D) bzw. epidermalen Defekten (Laserskin) eingesetzt (Hoppe, 2006).

6. Enzyme und Laborkits

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
iTaq™ DNA-Polymerase Sample	Bio-Rad
M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant	Promega
Dispase II	Roche
Trypsin/EDTA	Biochrom

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Laborkits

Laborkit	Bezugsquelle	Verwendung
NucleoSpin [®] RNA II	Macherey-Nagel	RNA-Isolation
LightCycler [®] FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I	Roche	RT- qPCR
LightCycler [®] Control Kit DNA	Roche	RT- qPCR
Taq-DNA-Polymerase „all inclusive“	Peqlab	reverse Transkription
WST-1 Reagent	Roche	Messung der Zell- proliferation

7. Zellen

humane Fibroblasten: Primärkultur dermalen Zellen isoliert aus humanen Mundschleimhautstücken

humane Keratinozyten: Primärkultur epidermalen Zellen isoliert aus humanen Mundschleimhautstücken

mvEC: Primärkultur mikrovaskulärer Endothelzellen isoliert aus humaner Dermis

8. Oligonukleotide

Tabelle 7: Oligonucleotide für die konventionelle PCR

Name	Länge (nt)	Sequenz (5'-3')	Verwendung	T _m (°C)	Produktlänge (bp)
beta-actin forw.	23	CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC	Referenzgen β -Actin	68	384
beta-actin rev.	23	GATGGAGCCGCCGATCCACACGG	Referenzgen β -Actin	68	384
Kol.IV forw.	20	CTCTACGTGCAAGGCAATGA	Kollagen IV	58	207
Kol.IV rev.	20	TCTTATGTTTTCCCCGTGA	Kollagen IV	58	207

Tabelle 8: Oligonucleotide für die RT- qPCR (LightCycler® 1.5, Roche)

	Länge (nt)	Sequenz (5'-3')	Verwendung	T _m (°C)	Produktlänge (bp)
ACTB left	18	CCAACCGCGAGAAGATGA	Referenzgen β-Actin	60	97
ACTB right	20	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	Referenzgen β-Actin	59	97
COL4A1 left	20	CGGGTACCCAGGACTCATAG	Kollagen IV	59	60
COL4A1 right	20	GGACCTGCTTACCCTTTTC	Kollagen IV	60	60
KRT13 left	20	CGAGAGCCTGAATGAAGAGC	Keratin 13	60.24	80
KRT13 right	20	CGACCACCTGGTTGCTAAAT	Keratin 13	59.99	80
LAMC1 left	20	ACAGCGAGACCTGTGATCCT	Laminin 1	59,87	86
LAMC1 right	20	CCCATCACTGCACTTCTCAC	Laminin 1	59,26	86
LAMC2 left	20	GGGCAATGCCACTTTTTATG	Laminin 5	60.32	65
LAMC2 right	20	CCTGCAGGTCAAACCTCTCTG	Laminin 5	58.59	65
KRT14 left	20	TTGAGAGCCTGAAGGAGGAG	Keratin 14	59.67	70
KRT14 right	20	CCTCTCAGGGCATTTCATCTC	Keratin 14	59.76	70

9. DNA-Größenmarker

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten in 1,7 % Agarosegelen wurden die 50 bp peqGOLD DNA-Leiter (Abbildung 15) und die 100 bp peqGold DNA-Leiter (Abbildung 16) von Peqlab verwendet.

Tabelle 9: 50 bp DNA-Leiter

Fragment	50 bp DNA-Leiter Größe in bp
1	1000
2	900
3	800
4	700
5	600
6	500
7	400
8	300
9	250
10	200
11	150
12	100
13	50

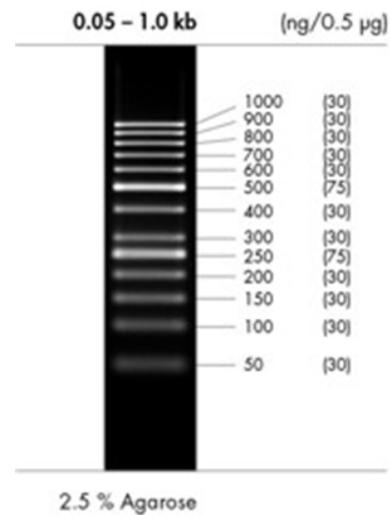


Abbildung 15:
50 bp DNA-Leiter [Peqlab]

Tabelle 10: 100 bp DNA-Leiter Plus

Fragment	100 bp DNA-Leiter Größe in bp
1	3000
2	2000
3	1500
4	1200
5	1000
6	900
7	800
8	700
9	600
10	500
11	400
12	300
13	200
14	100

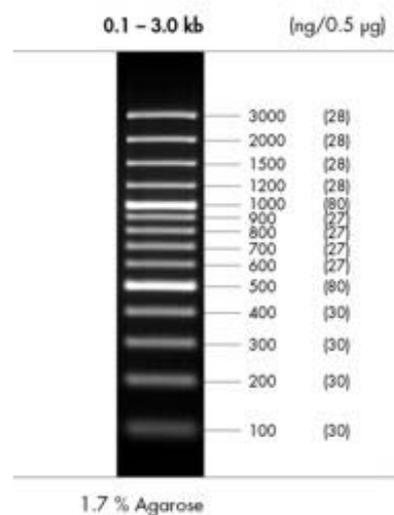


Abbildung 16:
100 bp DNA-Leiter Plus [Peqlab]

10. Antikörper

Primärantikörper:

Tabelle 11: Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Anti-Spezies	Bezugsquelle	eingesetzte Konzentration
CD90, Thy-1 (Fibroblastenmarker)	Maus	Mensch	Dianova	1:50
Cytokeratin 14	Kaninchen	Mensch	Dianova	1:100
Cytokeratin 5	Maus	Mensch	Dianova	1:75
Vimentin	Ziege	Mensch	Dianova	1:50
Kollagen IV	Maus	Mensch	Dianova	1:50
Laminin 5 (Epiligrin)	Maus	Mensch	Chemicon	1:50
KI-67 Antigen (MIB-1)	Maus	Mensch	Dako	1:150
Cytokeratin 13	Maus	Mensch	Dianova	1:100
Cytokeratin 10	Maus	Mensch	Chemicon	1:100
Filaggrin	Maus	Mensch	Dianova	1:100

Tabelle 12: Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Anti-Spezies	Bezugsquelle	eingesetzte Konzentration
F(ab)2-Do anti-Ms Cy3	Esel	Maus	Dianova	1:100
F(ab)2-Do anti-Go FITC	Esel	Ziege	Dianova	1:100
F(ab)2-Do anti-Rb Cy2	Esel	Kaninchen	Dianova	1:100

11. Software

Tabelle 13: verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Name	Verwendung	Quelle
Endnote	Literaturverwaltungsprogramm	Universitätsklinikum Würzburg
JabRef reference manager	Literaturverwaltungsprogramm	Open Source http://jabref.sourceforge.net/
ImageJ	Bildbe- und verarbeitungsprogramm zur Auswertung von Gel-Bildern der Elektrophorese	Open Source http://rsbweb.nih.gov/ij/
Primer3	Programm für das Primerdesign	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
Genecards	Datenbank der menschlichen Gene und ihrer Produkte mit Bezug zu Krankheiten	http://www.genecards.org/
Adobe Photoshop CS3	Bildbe- und verarbeitungsprogramm	Universitätsklinikum Würzburg
IBM SPSS Statistics 18	Programm zur Erstellung von statistischen Analysen	Universitätsklinikum Würzburg

V. Methoden

1. Methoden der Zellbiologie

1.1 Isolation von primären humanen Zellen

1.1.1 Isolation von Fibroblasten

Für die Isolation von Fibroblasten wurden klinisch gesunden Patienten bei Routineoperationen wie Weisheitszahnentfernung oder prothetischen Eingriffen nach deren schriftlicher Zustimmung Mundschleimhautproben in der Größe von ca. 5 x 5 mm entnommen. Das Gewebe wurde zuerst für 5 min mit 70 % EtOH desinfiziert, danach dreimal für je 5 min mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine mechanische Trennung mit dem Skalpell in Epithel- und Bindegewebe. Zur Gewinnung von Fibroblasten wurde das Bindegewebe in kleine Stücke geschnitten und diese als Explantate in Kulturschalen, die 10 ml DMEM/F12 Medium mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep und 0,1 % Fungizone enthielten, kultiviert. Nach 3 - 7 Tagen begannen die Fibroblasten aus den Gewebestücken heraus zu wachsen. Die Zellen wurden in einem Zellkulturbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % weiter kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage. Nach 7 - 10 Tagen wurden die Gewebestücke entfernt. Somit blieben nur die angewachsenen Zellen in den Kulturschalen. Spätestens bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen geerntet und entweder weiter passagiert oder für Versuche verwendet.

1.1.2 Isolation von Keratinozyten

Zur Isolation von Keratinozyten wurde die in V 1.1.1 für Fibroblasten beschriebene Methode unter Verwendung von epitheliale Gewebe durchgeführt. Das Gewebe wurde ebenfalls in kleine Explantate zerschnitten und in Kulturschalen, die DMEM/F12 Medium mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep und 0,1 % Fungizone enthielten, kultiviert.

Die Keratinozyten begannen kreisförmig um die Probe herum aus dem Mundschleimhautstück heraus zu wachsen. Dabei adhärten die Zellen sehr stark aneinander. Bei Erreichen eines Durchmessers von 3 - 4 cm wurden die Zellen geerntet. Dabei löste man die Zellen mit 5 ml Alfasyme vom Boden der Kulturschale und erhielt ein zusammenhängendes „Häutchen“ aus Keratinozyten. Um eine homogene Suspension aus Einzelzellen zu erhalten, wurden sie in 0,5 ml Dispase II (240 U/100 ml, Roche) für 15 - 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einer Pipette mehrfach resuspendiert. Die Zellen konnten nun gezählt und weiter passagiert oder für Versuche verwendet werden.

1.1.3 Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen (mvEC)

Für die Zellisolation von mvEC wurde der Dermisanteil einer Mundschleimhautprobe zunächst dreimal mit DPBS-Lösung gespült, bevor er mit dem Skalpell in 1 - 2 mm große Stücke zerschnitten wurde. Es erfolgte über Nacht ein Verdau der Gewebestücke mit Dispase-Lösung im Kühlschrank bei 4 °C. Die Dermisstücke wurden einmal mit 10 ml PBS⁻/EDTA gespült, bevor sie nochmals mit 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 40 min im Brutschrank enzymatisch verdaut wurden. Die Enzym-Reaktion wurde sofort im Anschluss mit 10 % FCS gestoppt. Zur Isolation der Zellen wurden die Gewebestücke in eine Schale mit ECGM MV (Endothelial Cell Growth Medium MV, Promocell) überführt und jedes Stück mit dem Skalpell unter leichtem Druck von allen Seiten ausgestrichen und danach verworfen. Die entstandene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (70 µm Porengröße) in ein 50 ml Falcon überführt, um Gewebereste zu entfernen, und anschließend zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 4 ml ECGM MV aufgenommen, die Zellen gezählt und in kleine Zellkulturflaschen (25 cm² Kulturfläche) ausgesät. Nach 3 - 4 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel um eine Verunreinigung der Kultur mit nicht erwünschten Zelltypen zu minimieren.

1.2 Kultivierung der Zellen

1.2.1 Zellkultur

Eukaryotische Zellen wurden in einem Zellkulturbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % in speziellen Kulturschalen gehalten. Die verwendeten Puffer und Medien wurden stets auf 37 °C vorgewärmt. Es war darauf zu achten, dass zugegebene Lösungen niemals direkt auf den Zellrasen pipettiert wurden, um ein Abschwemmen der Zellen zu vermeiden.

1.2.2 Passagierung

Kurz vor Erreichen eines Monolayer müssen die Zellen auf neue Kulturflaschen aufgeteilt werden, um Kontaktinhibition zu vermeiden. Dabei wurden die Zellen mit Alfazyme vom Boden der Zellkulturschale gelöst und Fibroblasten in einer Zellzahl von 5E5 Zellen/Schale in neuen Zellkulturschalen mit 10 ml frischem DMEM/F12 Medium wieder ausgesät, Keratinozyten in einer Zellzahl von 1E6 Zellen/Schale in KGM Medium.

Fibroblasten:

Das alte Medium wurde aus der Kulturschale entfernt und die Zellen einmal mit 5 ml DPBS gewaschen. Es wurden 5 ml Alfazyme auf die Zellen gegeben und diese für ca. 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die in Alfazyme gelösten Zellen resuspendiert, 5 ml Medium dazu gegeben und nochmals resuspendiert, um Wiederanheftung an den Untergrund oder Verklumpungen zu vermeiden. Das Medium sollte 10 % FCS enthalten, um die Enzymreaktion zu stoppen. Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT) und das Pellet erneut in 1 ml frischem Medium resuspendiert, bevor die Zellzählung durchgeführt wurde.

Keratinozyten:

Da bei Keratinozyten die Zellen nach der Alfazyme-Behandlung noch stark aneinander haften wurden die Zellen nach Ernte der Passage 0 im Anschluss 15 - 20 min in 0,5 ml Dispase II (240 U/100 ml, Roche) im Brutschrank inkubiert um Einzelzellen zu erhalten, bevor sie mit 1 ml KGM aufgefüllt, resuspendiert und anschließend zentrifugiert wurden. Bei Ernte der weiteren Passagen wurde Trypsin/EDTA anstatt Alfazyme zum Lösen der Zellen verwendet, da die Keratinozyten stärker am Boden der Kulturschale haften als die Fibroblasten. Vor der Zellzählung wurde das alte Medium verworfen und das Pellet in 1 ml KGM aufgenommen.

1.2.3 Zellzählung

Die Konzentrationsbestimmung von Zellsuspensionen erfolgte mit dem „CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System“, Modell TTC (Schärfe Systeme, Reutlingen). Dabei wird das Widerstandsmessprinzip als Bestimmungsverfahren mit der Pulsflächenanalyse zur Signalauswertung kombiniert. Die Zellen werden mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine 150 µm-Messpore gesaugt, wobei sie beim Durchtritt durch die Messpore eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung verdrängen. Im Gegensatz zu toten Zellen, die nur über die Größe ihres Zellkerns erfasst werden, können intakte Zellen in erster Näherung als Isolator betrachtet werden. Daher kommt es zu einer Widerstandserhöhung über die Kapillarstrecke, wenn die Zellen die Messpore einzeln passieren.

Zur Messung gab man 10 - 100 µl Zellen, die in Nährmedium gut homogenisiert wurden, in ein Zählröhrchen mit vorgelegten 10 ml CASY[®]ton. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Messung durchgeführt. Es wurde ein Messbereich zwischen 0 und 40 µm vorgewählt und das Messfenster für lebende Zellen, orientierend an der Normalverteilung der Zellgröße, für Keratinozyten zwischen 11 und 40 µm, für Fibroblasten für 11,5 und 40 µm festgelegt.

Das Gerät führt automatisch drei Einzelmessungen mit Volumina von je 200 µl durch und bildet daraus einen Mittelwert. Mit Hilfe der integrierten Auswertungssoftware CASYstat (Schärfe Systeme, Reutlingen) wurde der Verdünnungsfaktor eingerechnet und die Zellzahl pro 1 ml unverdünnter Suspension angegeben.

1.2.4 Langzeitlagerung

Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Nachdem die Zellen, wie zuvor beschrieben, mit Alfasyme von der Kulturschale gelöst wurden, resuspendierte man diese in 5 ml Kulturmedium und zentrifugierte bei 1000 rpm und RT für 5 min. Das Pellet wurde in 2 ml Kryomedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses bewahrte man zum Vorkühlen zunächst für 1 - 2 Wochen bei - 80 °C in einer Isopropanol-Box auf und gab es anschließend in flüssigen Stickstoff (- 196 °C).

Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden diese in einem Wasserbad bei 37 °C kurz geschwenkt. Die Temperatur soll die toxische Wirkung von DMSO minimieren, das den Zellen zum Einfrieren beigefügt wurde. Die aufgetaute Suspension wurde sofort in ein Falcon mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Zum Schluss wurde das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen und die Zellzählung zur Aussaat in neue Kulturschalen vorgenommen.

1.2.5 Messung der Zellproliferation und Zellvitalität (WST-1/Zellzählung/ PDLs)

WST-1 Assay

Eine Messung der metabolischen Zellaktivität wurde mit dem WST-1 Assay (Roche) durchgeführt. Dieser kolorimetrische Test basiert auf der intrazellulären Reaktion eines Tetrazoliumsalzes (WST-1; 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat), das durch zelluläre Enzyme von vitalen Zellen reduktiv in Formazan aufgespalten wird. Dabei entsteht ein Farbumschlag von rot nach gelb-orange, der photometrisch gemessen werden kann. Die Absorption steht im linearen Verhältnis zur Anzahl vitaler Zellen.

Je nach verwendeter Kulturschale wurde eine entsprechende Menge WST-1-Reagenz 1 : 10 mit Kulturmedium gemischt und auf die Zellen gegeben (200 - 1000 µl Medium mit 20 - 100 µl WST-1), die zuvor mit DPBS gewaschen wurden. Die mit dem Reagenz bedeckten Zellen wurden für 15 - 60 min im Brutschrank inkubiert. Es wurde immer ein Leerwert aus der selben Medium/WST-1-Mischung mitgeführt, der in einem leeren Well der entsprechenden Platte inkubiert wurde. Nach Inkubation wurden je 100 µl aus jedem zu messenden Well (inklusive Leerwert) in eine Mikrotiterplatte überführt und bei einer Wellenlänge von 440 nm mit einem Referenzfilter von 690 nm im Photometer (Tecan, Rainbow) gemessen.

Erstellung von Wachstumskurven (Zellzählung)

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden Zellen in einer Dichte von $2,5E3$ Zellen/cm² in 24-Well Platten ausgesät und nach 4, 7, 14 und 21 Tagen eine Zellzählung mit dem „CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System“ durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 ml Alfasyme oder Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschale gelöst und gut resuspendiert. Nach Zugabe der gleichen Menge an Medium wurde die Suspension zentrifugiert, und das Pellet in 1 ml frischem Medium gelöst. Davon wurden 10 µl mit 10 ml Isoton vermischt und die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählgerätes bestimmt.

Bestimmung des replikativen Potentials über die Bestimmung von Populationsverdopplungen (population doubling level, PDL)

Primäre humane Zellen bewegen sich im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien im Zuge aufeinanderfolgender Zellteilungen auf einen gemeinsamen Punkt hin, an dem die Wahrscheinlichkeit abnimmt, dass der Zellzyklus ganz zu Ende geführt wird (Seneszenz). Diese Zellen besitzen je nach Gewebespender, Alter des Spenders und Gewebeursprung unterschiedliche Wachstumseigenschaften.

Um das replikative Potential und somit das *in vitro* Verhalten der in dieser Arbeit verwendeten Zellen im Verlauf der Kulturzeit zu untersuchen, wurde der PDL (Formel 1) von Fibroblasten und Keratinozyten bestimmt. Dazu wurden die Zellen über mehrere Passagen hinweg bis zu einer Konfluenz von 70 – 90 % im Brutschrank inkubiert, bei Keratinozyten bis zum Wachstumsstopp (Seneszenz) und der PDL mit folgender Formel über die eingesetzte sowie geerntete Zellzahl berechnet. Als Ausgangswert wurden bei Keratinozyten 1E6 Zellen pro Kulturschale (Ø 10 cm), bei Fibroblasten 2E5 Zellen pro Kulturschale (Ø 10 cm) eingesetzt.

Formel 1: population doubling level

$$PDL = (\log Y - \log X) / \log 2$$

Dabei stellt Y die Zellzahl am Ende und X die ursprünglich ausgesäte Zellzahl dar.

1.3 Besiedelung der Zellträger (Scaffolds)

1.3.1 Herstellung von Dermal-Äquivalenten (Fibroblasten auf Scaffolds)

Für die Herstellung von Dermal-Äquivalenten wurden die Scaffolds unter sterilen Bedingungen in 1 cm x 1,3 cm Stücke geschnitten (Abbildung 17 a). Die Probengröße erlaubt die Kultivierung der Proben in 12-Well Platten. Zudem stimmt diese Probengröße mit der Größe des Rahmens eines 8-Well Culture-Slides (Rahmen eines Wells) überein, der aus Zellkultur-kompatiblen Polystyrol besteht. Der Rahmen wurde benutzt, um die Scaffolds in den Zellkulturgefäßen zu fixieren da sicher gestellt werden sollte, dass die Zellen auf der epidermalen Seite der Scaffolds wachsen und nicht auf der dermalen Seite am Boden des Zellkulturgefäßes (Abbildung 17 b). Die Rahmen wurden mit Titanplättchen beschwert, um ein Abrutschen vom Scaffold zu vermeiden (Abbildung 17 c). Die 0,7 cm² große Oberfläche der Scaffolds innerhalb der Rahmen wurde mit 2×10^5 Fibroblasten pro cm² in 0,5 ml DMEM/F12 Medium besiedelt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % inkubiert. Außerhalb des Rahmens wurden zusätzlich 2 ml Medium in das Kulturgefäß gegeben um den Druck innerhalb und außerhalb des Rahmens gleich zu halten. Die Rahmen und Metallplättchen wurden am nächsten Tag, nach Absinken und Anwachsen der Zellen, entfernt und die Scaffolds für weitere 1 - 6 Tage in 12-Well Platten kultiviert wobei das Medium alle 2-3 Tage durch frisches DMEM/F12 Medium ersetzt wurde (Abbildung 18).



Abbildung 17:

Aussaat von Fibroblasten auf Scaffolds: (a) zeigt ein 1 cm x 1,3 cm großes Stück einer Membran in einem Well einer 12-Well Platte, das mit einem Rahmen aus Polystyrol fixiert wurde (b), um sicher zu stellen, dass die Zellen auf der epidermalen Seite des Scaffolds anwachsen. Auf diese Weise entstehen 0,7 cm² große Probengefäße in die die Zellen gesät werden. Das Konstrukt wurde zum Schluss mit einem Gewicht (Titanplättchen) stabilisiert (c)

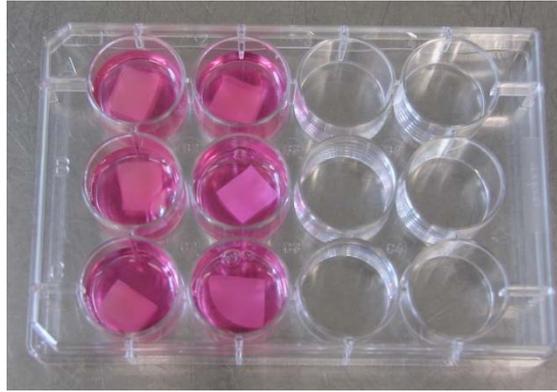


Abbildung 18:
Kultur von Fibroblasten auf Scaffolds. Die Membranen wurden in 12-Well Platten in 3 ml Medium für 2 - 7 d kultiviert

1.3.2 Herstellung von Oralmukosa-Äquivalenten (Fibroblasten und Keratinozyten auf Scaffolds)

Um Oralmukosa-Äquivalente zu erhalten wurde die Oberfläche der Dermal-Äquivalente nach 2- oder 7-tägiger Kultur der Fibroblasten in DMEM/12 mit 5×10^5 Keratinozyten pro cm^2 besiedelt. Dazu wurde die selbe Methode wie zur Herstellung von Dermal-Äquivalenten verwendet: die Scaffolds wurden in der ersten Nacht nach Aussaat der Zellen mit Plastikrahmen fixiert und Titanplättchen beschwert. Anschließend wurden die Scaffolds in 12-Well Platten transferiert und für weitere 6 - 13 Tage kultiviert. Dabei wurde Green`s Medium verwendet, da die Keratinozyten in diesem Medium aneinander adhäreren und differenzieren können. Nur so kann eine gleichmäßige Zelloberfläche und eine mehrschichtige Zellstruktur erhalten werden. Das Medium wurde alle 2 - 3 Tage durch frisches Green`s Medium ersetzt.

1.3.3 Kultivierung der Oralmukosa-Äquivalente an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche („Air Liquid Interface“)

Als weitere Kultivierungsmethode wurde die Kultur der Oralmukosa-Äquivalente an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche („Air Liquid Interface“, ALI) eingesetzt. Dazu wurden zunächst Oralmukosa-Äquivalente wie in V 1.3.2 hergestellt. Im Unterschied zur Kultivierung in V 1.3.2 wurden die Scaffolds nach Anwachsen der Zellen nicht in 12-Well Platten in Green`s Medium kultiviert, sondern in 6-Well Platten transferiert, in die vorher Filter mit 70 µm Porengröße gelegt wurden. Diese Konstrukte wurden mit Green`s Medium gerade so weit aufgefüllt (3 - 5 ml), dass die Scaffolds das Medium berühren. Die Oberfläche sollte jedoch an der Luft sein (Abbildung 19). Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen unterhalb des Filters ansammeln, da sonst die Versorgung des Scaffolds mit Medium durch Diffusion nicht gewährleistet werden kann. Der Mediumwechsel erfolgte wieder alle 2 - 3 Tage, wobei die Oberfläche der Scaffolds dabei mit einigen Tropfen Medium benetzt wurde um sie feucht zu halten.

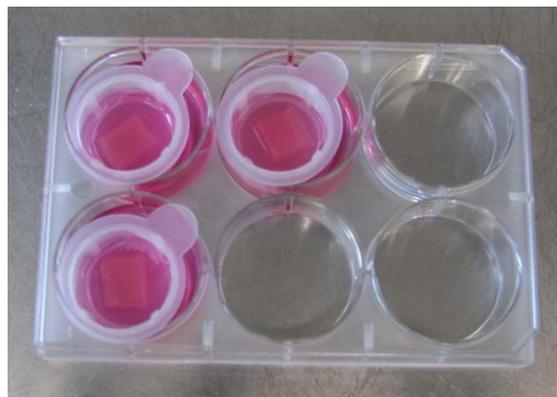


Abbildung 19:
Kultur von Fibroblasten und Keratinozyten auf Scaffolds am „Air Liquid Interface“. Die Membranen wurden in 6-Well Platten auf Filtern mit 70 µm Porengröße an der Grenze von Flüssigkeit und Luft kultiviert. Die Füllmenge der Wells beträgt 4-6 ml

2. Histologische Methoden

2.1 Vorbereitung der Gewebeproben für die Kryosektion

Das fertige Ersatz-Gewebe wurde für 6 - 24 h in 4 % PFA-Lösung fixiert und anschließend über Nacht in 18 % Succrose-Lösung bei 4 °C inkubiert. Zur Einbettung wurden Einbettförmchen (Sakura) mit dem Einbettmittel Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura) gefüllt. Anschließend wurden die Proben in den Einbettschälchen in der gewünschten Orientierung platziert und auf Trockeneis eingefroren. Die so vorbereiteten Proben wurden aus den Schälchen genommen, in Alufolie eingewickelt, und bis zur Weiterverarbeitung bei - 80 °C gelagert.

2.2 Herstellung und Aufbewahrung der Kryoschnitte

Die Kryoschnitte der Proben wurden entweder am Kryostat HM500 OM (Mikrom) oder am Kryostat Typ MNT (SLEE) bei einer Kammertemperatur von - 23 °C und einer Objektträgerkopf-Temperatur von - 23 °C hergestellt. Dazu wurden die Proben zunächst auf dem Objektischchen des Kryostates mit etwas Tissue Tek O.C.T. Compound befestigt. Anschließend wurde das Objektischchen mit der Probe in die Haltevorrichtung am Gerät eingespannt und im richtigen Winkel zum Messer ausgerichtet, um die Kryosektion durchzuführen. Die Schnittstärke wurde möglichst dünn eingestellt. Bei TFE und SIS eigneten sich 8 µm, bei DRT und Vicryl 10 µm. Die Schnitte wurden auf Polylysin-beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser) aufgenommen, um ein gutes Haften der Schnitte auf dem Objektträger zu gewährleisten und zu verhindern, dass sie im Verlauf der im Anschluss durchgeführten Färbung herunter gespült werden. Dabei wurden jeweils vier Schnitte auf einen Objektträger in Paaren angeordnet aufgenommen: ein Paar zur Färbung, eines für die Negativkontrolle. Die Schnitte wurden in Objektträgerboxen bei - 20°C oder - 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.3 Häkalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Diese Färbemethode wurde als Übersichtsfärbung verwendet, um die Morphologie der Ersatzhaut zu beurteilen. Die Kryoschnitte wurden 30 min aufgetaut, kurz in Leitungswasser gespült um das restliche Einbettmittel zu entfernen, und anschließend 5 min in Häkalaunlösung nach Mayer, die vorher gefiltert wurde, gefärbt. Danach wurden die Schnitte für 5 min mit Leitungswasser gespült bevor die Gegenfärbung mit Eosinlösung für 5 min erfolgte. Nach einminütiger Spülung mit Leitungswasser wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

Nach der Färbung werden basophile Verbindungen wie z. B. Nukleinsäuren im Zellkern blau, die übrigen Strukturen wie Zytoplasma oder Interzellulärsubstanzen in verschiedenen Rottönen dargestellt.

Häkalaunlösung nach Mayer:

1 g Hämatoxylin in 10 ml 100 % Ethanol lösen und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen. Zugabe von 0,17 g Natriumiodat und 50 g Kalium-Aluminium-Sulfat.

Eosinlösung:

1 g Eosin in 100 ml destilliertem Wasser lösen.

Eine weitere Variante dieser Färbung wurde mit Hilfe von fertig angesetzten Reagenzien der Firma Merck durchgeführt. Dazu rehydrierte man die Schnitte zunächst in typischer Weise, bevor sie in Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III für 3 min gefärbt wurden. Die Schnitte wurden für 2 s in 0,1 % HCl Lösung gespült, bevor sie für 3 - 5 min in fließendem Leitungswasser differenziert wurden. Die Gegenfärbung erfolgte in 0,5 % wässriger Eosin G-Lösung für 3 min. Nach einem Spülvorgang in Leitungswasser für 30 s wurden die Schnitte wie bereits beschrieben, mit Mowiol eingedeckt.

Der Vorteil dieser Methode liegt neben der Schnelligkeit in der Verwendung der Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III, da diese nicht vor ihrer Verwendung gefiltert werden muss, wie die Häkalaunlösung nach Mayer.

2.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Um spezifische Zellbestandteile in mikroskopischen Präparaten zu färben wurden immunhistochemische Antikörperfärbungen durchgeführt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) erfolgt zunächst eine Inkubation der Präparate mit einem Primärantikörper, der spezifisch ein Epitop des zu untersuchenden Proteins binden kann. Die Färbung erfolgt in einem zweiten Schritt, indem ein zweiter fluorochrom markierter Antikörper auf die Probe gegeben wird, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet (Abbildung 20). In dieser Arbeit wurden Sekundärantikörper verwendet, die mit Cy2, Cy3 oder FITC gekoppelt waren. Das Absorptionsmaximum von Cy2 liegt bei 492 nm und sein Emissionsmaximum bei 510 nm, wodurch dieser Farbstoff wie FITC, dessen Absorptionsmaximum ebenfalls bei 492 nm, sein Emissionsmaximum jedoch bei 520 nm liegt, grün fluoresziert. Cy3 hat ein Absorptionsmaximum von 550 nm und ein Emissionsmaximum von 570 nm. Deshalb fluoresziert dieser Farbstoff rot.

Ein Vorteil der Verwendung von fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern ist, dass sie für alle in einem Tier produzierten Antikörper verwendet werden können. Daher ist es bei dieser Methode nicht notwendig, unter hohem Produktions- und Kostenaufwand für jedes Antigen einen eigenen fluoreszenzmarkierten Antikörper zu benutzen.

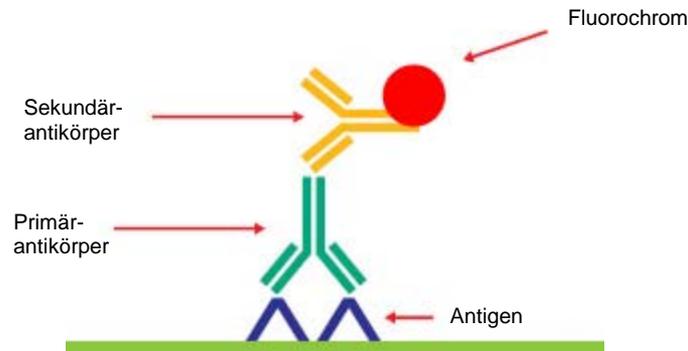


Abbildung 20:
Indirekte Immunfluoreszenz
Verändert nach Key, 2006

Es wurden verschiedene Primärantikörper zur Charakterisierung von Zellarten oder zur Feststellung von Reifungs- und Differenzierungsvorgängen der Mundschleimhautäquivalente eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Antikörper sind in IV 10. aufgelistet.

2.4.1 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Zur Analyse der Mundschleimhautäquivalente wurden Kryoschnitte dieser immunhistochemisch gefärbt. Dazu wurden die bei -20 °C oder -80 °C gelagerten Kryoschnitte zunächst ca. ¼ h aufgetaut und mit DPBS gespült, um das Tissue Tek O.C.T. Compound zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte mit einem PAP Pen (hydrophober Fettstift) umrandet, um Flüssigkeiten auf den Schnitten einzugrenzen und eine sichere Inkubation mit genügend hoher Antikörperkonzentration zu gewährleisten. Vor der Färbung wurden sie 2 x mit DPBS gewaschen. Anschließend permeabilisierte man die Zellen für 5 min mit 0,1 % Triton X-100 (gelöst in DPBS) und wusch sie wieder 3 x mit DPBS. Im nächsten Schritt folgte eine Inkubation mit 2 % Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in DPBS, zum Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen. Nun gab man 80 µl einer Lösung mit dem gewünschten ersten Antikörper in der in IV 10. beschriebenen Verdünnung in 0,5 % BSA auf die Schnitte und inkubierte alles unter Schwenken für 1 h bei RT. Vor Anwendung des zweiten Antikörpers wurden die Präparate wieder 3 x mit DPBS gewaschen. Von diesem wurden ebenfalls 80 µl in einer Verdünnung von 1:100 in 0,5 % BSA auf die Schnitte gegeben und im Dunkeln für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Zum Schluss wusch man die Zellen nochmals gut mit DPBS ab (3 x für 5 min), bevor man ein Deckglas auflegte. Auf einem Objektträger wurde neben der Färbung immer eine Negativkontrolle mit durchgeführt. Dazu wurde der 1. Antikörper weggelassen, durch 80 µl 0,5 % BSA ersetzt und nur der 2. Antikörper verwendet. Dadurch kann getestet werden ob der fluoreszenzmarkierte 2. Antikörper unspezifisch im Präparat bindet.

0,1 % Triton X-100:

50 µl Triton X-100 + 10 ml DPBS

BSA-Lösungen in DPBS:

2 %: 0,2 g BSA + 10 ml DPBS

0,5 %: 1,25 ml der 2%igen Lösung + 3,75 ml DPBS

Mowiol-DABCO:

6 g Glycerine +

6 ml H₂Odest. +

2,4 g Mowiol 4-88 +

12 ml 0,2 M TRIS Puffer pH 8 +

0,1 % DABCO

Alles wurde mit dem Magnetrührer 4 h gerührt. Danach ruhte die Mischung 2 h, bevor sie für 10 min bei 50 °C im Wasserbad erwärmt wurde. Anschließend wurde 15 min bei 5000 x g abzentrifugiert und der Überstand in Aliquots abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Anwendung:

- ein Aliquot Mowiol auftauen (nicht mehr einfrieren und innerhalb von 1 - 2 Tagen aufbrauchen)
- einen kleinen Tropfen auf den Objektträger geben
- Deckglas vorsichtig und ohne Druck auf den Tropfen geben
- mindestens 1 h polymerisieren lassen, bevor das Präparat im Mikroskop betrachtet wird; nach 12 h ist das Mowiol ganz auspolymerisiert

2.4.2 Immunhistochemische Färbung von Zellen im „Chamber-Slide“

Zur Charakterisierung von Zellen wurden diese in 8-Well Chamber-Slides ausgesät und immunhistochemisch gefärbt. Die eingesetzten Mengen beziehen sich im Folgenden immer auf ein Fach eines 8-Well Chamber-Slides.

Vor der Färbung wurden sie 2 x mit 500 µl DPBS gewaschen. Es folgte eine Fixierung der Zellen für 15 min mit 500 µl 4 % PFA in 0,1 M DPBS. Das weitere Vorgehen gleicht der Färbung von Kryoschnitten nur, dass 100 µl Antikörperlösung pro Well verwendet wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Aufbau des Chamber-Slides entfernt, ein Tropfen Mowiol auf die gefärbten Zellen gegeben und ein Deckglas aufgelegt.

2.5 Direkte Fluoreszenzfärbung

Um Zellkerne von eukaryotischen Zellen sichtbar zu machen, wurde die Methode der direkten Fluoreszenzfärbung eingesetzt. Dabei werden Fluorochrome verwendet, die direkt als Marker dienen, wie DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma) für DNA. Dieser Farbstoff wurde in einer Konzentration von 500 µg/ml bei -20 °C aufbewahrt und zur Färbung nochmals 1 : 10 mit 0,5 % BSA verdünnt. Er kann durch intakte Zellmembranen hindurch wandern und interkaliert in AT-reiche Regionen der DNA. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 358 nm und sein Emissionsmaximum bei 461 nm, wodurch mit DAPI angefärbte DNA blau fluoresziert. Dazu wurde den eukaryotischen Zellen in einem Well eines 8-Well Chamber Slides oder Kryoschnitten 80 - 100 µl der verdünnten Farbstoff-Lösung zugegeben und 10 min lang im Dunkeln unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit DPBS (3 x für 5 min) gewaschen und einige Tropfen Mowiol hinzu gegeben, bevor ein Deckglas aufgelegt wurde.

Bei einer parallelen Färbung durch indirekte Immunfluoreszenz wurde dem Präparat das DAPI nach Ende der einstündigen Inkubationszeit mit dem zweiten Antikörper hinzu gegeben. Die weitere Behandlung des Präparats erfolgte wie oben beschrieben.

3. Mikroskopie

3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Histologische Fluoreszenzpräparate wurden am Fluoreszenzmikroskop Axiolab, HBO 50/AC von Zeiss ausgewertet und dokumentiert.

Dazu wurden die Präparate jeweils bei verschiedenen Vergrößerungen (100-fach, 200-fach, 400-fach) fotografiert. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz jeden Bildes mit einer Negativkontrolle (nur zweiter Antikörper, kein erster Antikörper) und einer Positivkontrolle (Originalgewebe) verglichen.

3.2 Elektronenmikroskopie

3.2.1 Präparation der Proben (Fixierung, Entwässerung)

Die zu untersuchenden Proben wurden aus dem Medium genommen und mehrmals gut mit DPBS gewaschen, bevor sie durch Überschichtung mit 6,25 % Glutaraldehyd für 15 min bei 4 °C fixiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Aceton. Hierfür wurden sie nacheinander zunächst 5 mal für je 5 min in DPBS auf Eis, anschließend 15 min in 30 % Aceton, 20 min in 50 % Aceton, 30 min in 75 % Aceton, 45 min in 90 % Aceton und 5 mal je 30 min in 100 % Aceton bei RT inkubiert. Die Proben konnten bis zur Weiterverarbeitung in 100 % Aceton gelagert werden.

3.2.2 Kritische Punk-Trocknung

Zunächst wurden die entwässerten Präparate (V 3.2.1) in eine mit Aceton gefüllte Druckkammer des „*Critical Point Dryers*“ gegeben. Hier wurde unter Druck das Aceton gegen flüssiges CO₂ bei 4 °C ausgetauscht. Um einen vollständigen Austausch zu gewährleisten wurde der Vorgang 10 mal vor der Trocknungsphase wiederholt. In dieser wurde die Temperatur auf 40 - 42 °C erhöht und das gasförmige CO₂ langsam abgelassen.

3.2.3 Sputtern

Mit Hilfe von beidseitig klebenden Kohlefolien wurden die, wie in V 3.2.2 beschrieben, getrockneten Präparate auf REM-Trägertischchen montiert und im Sputter Coater Emitech K 550 mehrmals für einige Minuten mit Gold bedampft.

3.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) präparierte Objekte wurden bei 100-facher bis 1000-facher Vergrößerung im ZEISS DSM 940 (*Carl Zeiss AG, Oberkochen*) betrachtet und durch Photographie dokumentiert.

4. Methoden der Molekularbiologie

4.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem „Total RNA Isolation-Kit“ von Macherey-Nagel. Zuerst wurde das Gewebe in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem Pulver fein zermahlen. Dieses wurde in 350 µl RA1-Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und dadurch lysiert. Die entstandene Lösung wurde auf eine Nucleospin[®]-Filtersäule gegeben und bei 11000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der gefilterten Flüssigkeit 350 µl 70 % Ethanol zugegeben bevor man sie auf eine Säule zur Bindung der RNA (Nucleospin[®] RNA II) überführte. Diese erfolgte durch Zentrifugieren für 30 s bei 11000 rpm. Es folgte eine Entsalzung der RNA, die nun an die Membran in der Filtersäule gebunden vorlag, durch Zugabe von 350 µl MDB („*Membrane Desalting Buffer*“) und Zentrifugation von 1 min bei 11000 rpm. Dies steigerte die Effizienz des folgenden rDNase Verdau. Hierzu wurde zunächst ein DNase-Reaktionsmix aus 10 µl rDNase und 90 µl Reaktionspuffer hergestellt, von dem im Anschluss 95 µl auf die Membran gegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug 15 min. Es folgten verschiedene Wasch-Schritte, zunächst mit 200 µl RA2-Puffer, dann mit 600 µl RA3-Puffer. Zwischen diesen wurde jeweils für 30 s bei 11000 rpm zentrifugiert. Nach einem dritten Wasch-Schritt mit 250 µl RA3-Puffer wurde noch einmal für 2 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss konnte die RNA mit 40-60 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation von 1 min bei 11000 rpm eluiert werden. Die Lagerung der RNA erfolgte bei - 80°C.

4.2 Qualitätskontrolle der RNA

Um verlässliche RT-qPCR Ergebnisse zu erhalten muss die Qualität der für Expressionsstudien verwendeten RNA überprüft werden. Dies erfolgte über die Betrachtung der Agarose-Gelelektrophorese der isolierten Gesamt-RNA. Dabei wurden denaturierende MOPS-Formaldehydgele verwendet und ein formaldehydhaltiger MOPS Laufpuffer auf Basis von DEPC behandeltem Wasser (0,1 % DEPC-Lösung) zum Schutz der RNA vor RNasen. Auf dem Gel sollten bei intakter RNA zwei Banden sichtbar sein, die die 28S und 18S rRNA darstellen, was bei degradiertem RNA nicht der Fall ist.

0,1 % DEPC-Lösung:

500 ml H₂O mit 500 µl DEPC über Nacht inkubieren und das DEPC anschließend durch autoklavieren inaktivieren.

MOPS-Laufpuffer:

75 ml 10 x MOPS

15 ml 37 % Formaldehyd

660 ml H₂O_{DEPC}

10 x MOPS-Puffer:

MOPS	200 mM	5,23 g
Natriumacetat	50 mM	0,51 g
EDTA pH 7,0	10 mM	0,47 g

ad 125 ml H₂O_{DEPC}

MOPS-Formaldehydgel (100 ml):

1,5 g Agarose

10 ml 10 x MOPS (pH 7)

88 ml H₂O_{DEPC}

Das Gel wurde in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend zum Abkühlen in den Abzug gestellt. Bei einer Temperatur von ca. 65 °C wurden 1,8 ml 37 % Formaldehyd hinzugefügt und das Gel nach gutem Mischen in eine Laufkammer gegossen.

4.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Nanodrop ND-2000c (Peqlab) photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption von 1 µl der zu bestimmenden Probe bei 260 und 280 nm gemessen. Die optische Dichte von 1 entspricht bei 260 nm 40 µg RNA/ml.

Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt den Reinheitsgrad der RNA an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.4 Reverse Transkription

Der Ausdruck cDNA steht für komplementäre DNA, d.h. der Ursprung der DNA liegt nicht in der DNA selbst, sondern in der RNA. Retroviren, wie z.B. Vogel-Leukämie-Virus, Maus-Leukämie-Virus oder HIV, enthalten ein RNA-Genom, das mit Hilfe der Virus-kodierten reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in einer eukaryotischen Zelle in dsDNA umgeschrieben werden kann.

Die reverse Transkriptase dient als nützliches Werkzeug in der molekularen Genetik, da nicht nur virale RNA-Moleküle, sondern jede beliebige RNA unter geeigneten Bedingungen von der reversen Transkriptase als Matrize akzeptiert wird. Auf diesem Weg ist es möglich DNA-Kopien von mRNA-Molekülen herzustellen.

Reverse Transkription mit der M-MLV Reversen Transkriptase, RNase H Minus, Point Mutant (M-MLV RT (H-), Promega)

Zunächst wurden 0,2 - 1,0 µg RNA mit 0,5 µg eines oligo (dT)₁₅ Primers (Promega) versetzt und bis zu einem Endvolumen von 14 µl mit Nuclease-freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 70 °C für 5 min erhitzt. Dieser Schritt dient der Zerstörung von Sekundärstrukturen des Templates und der Anlagerung der Primer an komplementäre RNA-Sequenzen. Danach wurde der Ansatz sofort für 5 min auf Eis gekühlt, um zu vermeiden, dass sich die Sekundärstrukturen wieder bilden und folgende Zusätze der Reihe nach dazu pipettiert:

5x Reaktionspuffer (M-MLV RT Buffer)	5 µl
dNTPs 10 µM	1,25 µl
M-MLV RT (H-), 35-200 u/µl	0,5 µl
RNasin Plus RNase Inhibitor	1 µl
<hr/>	
	ad 25 µl Nuclease freies Wasser

Der Gesamtansatz wurde gemischt und 1 h bei 42 °C inkubiert. Zum Schluss folgte die Denaturierung der RNA und der Reversen Transkriptase bei 70 °C für 15 min. Die gebildete cDNA konnte entweder sofort als Template für eine PCR eingesetzt oder bei - 20°C gelagert werden.

4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

4.5.1 Klassische PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt ein automatisiertes Verfahren zur Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre Stränge gebunden sind, dar. Voraussetzung ist also, dass ca. 20 bp aus den Endbereichen der zu amplifizierenden DNA bekannt sind. Es werden hitzestabile Polymerasen, wie z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die Tfl-Polymerase aus *Thermus flavus* oder die Tth-Polymerase aus *Thermus thermophilus* verwendet. DNA-Polymerasen benötigen einen kurzen doppelsträngigen Bereich mit freiem 3'OH-Ende, um komplementäre DNA-Sequenzen zu synthetisieren. Entstandene DNA-Synthese-Produkte wurden bei 94 °C denaturiert und nach Hybridisierung der Oligonukleotide (i. d. R. bei 48 – 60 °C) amplifiziert.

Die Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung („Annealing“) und DNA-Synthese („Elongation“) wurden wiederholt, wodurch eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz möglich wurde.

Als Template kann gereinigte chromosomale DNA, isolierte Plasmid-DNA oder Bakterien-Zelllysat dienen.

Die Schritte sehen im Einzelnen wie folgt aus:

- **Denaturierung:** Doppelsträngige Ausgangs-DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen auf 94 °C in einzelsträngige DNA (ssDNA) überführt.
- **Annealing:** Hybridisierung eines bzw. mehrerer (i. d. R. zwei) für die Zielsequenz spezifischer Oligonukleotid-Primer an komplementäre Sequenzen; die in diesem Schritt gewählten Temperaturen hängen von der Schmelztemperatur und der Homologie der Oligonukleotide ab und liegen i. d. R. zwischen 48 °C und 60 °C.
- **Elongation:** Polymerisation (Vervielfältigung) der zwischen den Oligonukleotid-Primern liegenden DNA-Sequenz an den 3'OH-Enden der Primer durch die thermostabile Polymerase bei 72 °C.

Standard-PCR-Ansatz: (Taq-DNA-Polymerase Kit „all inclusive“ von Peqlab)

Tabelle 14: Standard-PCR-Ansatz nach dem Taq-DNA-Polymerase Kit „all inclusive“ von Peqlab

Komponente	Volumen/Reaktion (μl)	Endkonzentration
10 x Polymerase-Reaktionspuffer	5	1 x
5 x Enhancer P	10	1 x
dNTP Mix (40 mM)	1	800 μM
Upstream Primer	1	2 μM
Downstream Primer	1	2 μM
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,5	0,05 U/ μl
Template-DNA	1	ca. 10 - 500 ng
Steriles dest. H ₂ O	30,5 (ad 50 μl)	

Je nach verwendeten Primern und Templates variieren die am Thermocycler eingegebenen Einstellungen, besonders die Annealing-Temperaturen, die von der Sequenz und somit des Schmelzpunktes der Primer abhängen, und die Elongationszeit, die von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes abhängt (ca. 30 - 60 s / kbp).

Tabelle 15: PCR-Einstellungen

Phase	Dauer	Endtemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zyklenzahl
Aktivierung	3 min	94	1
Amplifikation	10 s (Denaturierung)	94	30
	45 s (Annealing)	53 - 60	30
	1 min (Elongation)	72	30
terminale Elongation	3 min	72	1

Für die Auswahl der Oligonukleotide wurde das Programm Primer3 verwendet, das folgende Kriterien für die Auswahl von Primern berücksichtigt:

- GC-Gehalt ca. 50 %
- ideale Länge 18 - 28 bp
- palindromische Sequenzen vermeiden
- Homologien der Primer zueinander vermeiden
- ausgewählte Schmelztemperatur beachten
- Größe des PCR-Produktes beachten

Um die Amplifizierung von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primersequenzen über eine Intron/Exon-Grenze gelegt.

Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer lässt sich zudem nach folgender Faustformel berechnen (Formel 2):

Formel 2: Schmelztemperatur der Primer

$$T_m = (n_A + n_T) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (n_G + n_C) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Diese Formel gilt nur für Primer mit Längen zwischen 18 und 24 Nukleotiden. Die optimale Annealing-Temperatur liegt ca. 2 - 5 °C unter dem niedrigeren beider berechneter Schmelzpunkte.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA:

Aufgrund ihrer elektrischen Ladung lassen sich DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe mittels Gelelektrophorese auftrennen.

Um DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel mit SYBR[®]GREEN I (MoBiTec) versetzt. Das SYBR[®]GREEN I interkaliert in doppelsträngige DNA, so dass sich unter einer UV-Lampe fluoreszierende DNA-Fragmente in Form von Banden sichtbar machen lassen.

Das Wanderungsverhalten der DNA hängt von folgenden Faktoren ab:

- Größe der dsDNA: Je größer das DNA-Fragment ist, desto langsamer wandert es in Richtung der Anode.
- Konformation der dsDNA: Relaxierte DNA wandert langsamer als die ringförmige superhelikale Form.
- Agarosegelkonzentration: Je nach Agarosegelkonzentration können 0,05 bis 30 kb große DNA-Fragmente aufgetrennt werden. Für die Auftrennung von 50 - 300 bp langen Amplifikaten wurde ein 1,75 % Agarosegel in einem 0,5 x TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, verwendet.

5 x TBE-Puffer:

Tris	54,0 g
Borsäure	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 ml
<hr/>	
	ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}

Herstellung eines 1,75 % Agarosegels

1,75 g Agarose wurden in 100 ml Laufpuffer (0,5 x TBE) kurz aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C goss man das Gel in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm und ließ es 30 - 45 min. bei RT auspolymerisieren.

8 µl der DNA-Proben wurden mit 1,6 µl 6 x Ladepuffer (Peqlab) gemischt, mit 1 µl SYBR®GREEN I versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Marker dienten 6 µl einer 50 oder 100 bp DNA-Leiter (Peqlab), die auf folgende Weise vorgemischt wurde:

DNA-Leiter:

DNA-Leiter (Stock)	1 µl
Ladepuffer	1µl
H ₂ O _{dest}	4 µl
Sybr Green	0,5 µl

SYBR®GREEN I:

Ausgangskonzentration: 1000 x konzentriert in DMSO

verwendete Konzentration: 1:500 verdünnt in DMSO

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 75 min.

Das Gel wurde anschließend unter der UV-Lampe betrachtet und die aufgetrennten DNA-Fragmente fotografiert.

4.5.2 Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)

Die quantitative Real-time PCR stellt eine moderne Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Hierbei werden nicht absolute Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern es wird die Kinetik der PCR-Reaktion ausgenutzt: in den frühen Zyklen werden meist nur nicht-detektierbare DNA-Mengen produziert, und auch die späten Zyklen (sog. Plateauphase) sind aufgrund der fehlenden logarithmischen Zunahme an PCR-Produkt uninformativ. Die quantitative Information in einer PCR-Reaktion wird von Zyklen geliefert, in denen die DNA-Menge logarithmisch vom Background bis in die Plateauphase hinein ansteigt. In der Regel fallen nur 4 oder 5 von 40 Zyklen in diesen "log-linearen" Teil der Kurve. Durch die Unterteilung der Probe in Aliquots kann diese Information aus den verwertbaren Zyklen entnommen werden. Über eine gelelektrophoretische Auftrennung wird der Anteil an PCR-Produkt mittels Fluoreszenzfärbung des Gels quantifiziert. Zum Färben des Gels wird entweder Ethidiumbromid oder SYBR[®]GREEN I verwendet. Beide Farbstoffe interkalieren in doppelsträngige DNA und können so PCR-Produkte sichtbar machen. Die Helligkeit des Fluoreszenzsignals wird gemessen und die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl in einem Diagramm aufgetragen. Durch die Mitführung von Standardwerten mit bekannten DNA-Konzentrationen können DNA-Mengen anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale quantifiziert werden (absolute Quantifizierung). Im Gegensatz dazu wird bei der relativen Quantifizierung die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Referenzgen bezogen. Durch den Einsatz von Standardkurven kann eine Effizienzkorrektur der Reaktion mit in die Berechnung einbezogen werden. Ein Kalibrator dient zur Normalisierung und gleicht kleine Schwankungen im System aus. Hierdurch wird es ermöglicht, die unterschiedlichen PCR-Läufe miteinander zu vergleichen. Die Quantifizierung mit Hilfe eines LightCyclers[™] vereinfacht diesen Prozess (Abbildung 21 - 23). Die Fluoreszenz der Proben wird kontinuierlich nach jedem Zyklus gemessen. Man verwendet SYBR[®]GREEN I, einen Farbstoff, der in die kleine Furche der DNA bindet. SYBR[®]GREEN I besitzt im nicht gebundenen Zustand eine relativ niedrige Fluoreszenz.

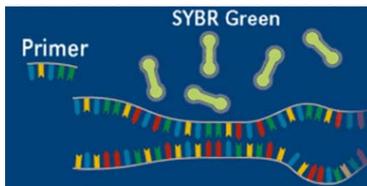


Abbildung 21:
Der Reaktionsansatz enthält dsDNA, Primer und SYBR[®]GREEN I
[<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>]

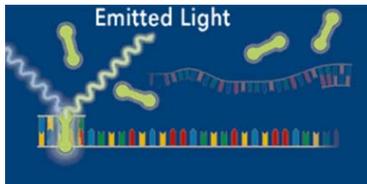


Abbildung 22:
SYBR[®]GREEN I interkaliert in dsDNA und emittiert Licht
[<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>]

Wenn die DNA-Menge in der PCR-Reaktion ansteigt, steigt proportional auch die Fluoreszenz des Farbstoffs.

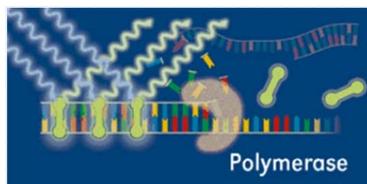


Abbildung 23:
Die DNA-Polymerase synthetisiert DNA, es interkaliert mehr SYBR[®]GREEN I und die Fluoreszenz steigt
[<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>]

Die Handhabung von SYBR[®]GREEN I ist unkompliziert, da es keine Sequenzspezifität besitzt, dadurch aber auch an jedes doppelsträngige Produkt bindet, egal ob es sich dabei um das gewünschte Produkt oder ein unspezifisches Nebenprodukt handelt. Um ausschließen zu können, dass die Fluoreszenz aus unspezifischen Nebenprodukten resultiert, wird im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Ist die Schmelztemperatur des gewünschten Produkts erreicht, kann eine starke Verringerung des Fluoreszenzlevels detektiert werden. Unspezifische Produkte schmelzen meist bei niedrigeren Temperaturen als die längeren spezifischen Produkte (Abbildung 24). Dies ermöglicht es Fluoreszenzsignale aus unspezifischen Produkten aus der Messung auszuschließen.

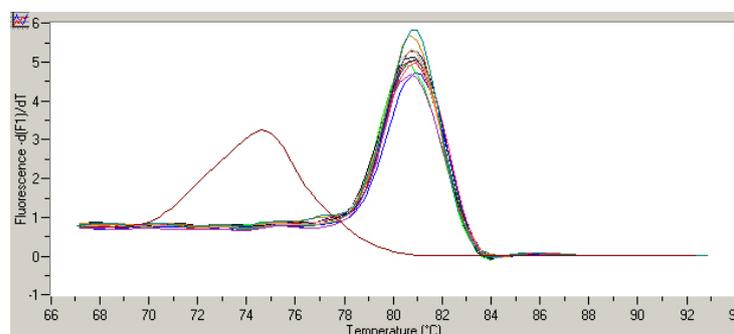


Abbildung 24:
Schmelzkurvenanalyse: Unspezifische Produkte wie Primerdimere schmelzen deutlich früher (hier bei ca. 75 °C) als das erwünschte PCR-Produkt (hier bei ca. 81 °C)

Reaktionsansatz für RT-qPCR (20 µl)

(LightCycler® FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I Kit, Roche)

Master Mix, 5 x conc.	4 µl
Primer (5 µM)	2 µl
DMSO	1 µl
H2O (PCR-grade)	8 µl
Template	5 µl (1:10 Verdünnung der cDNA)

RT-qPCR-Bedingungen

Tabelle 16: Standardbedingungen RT- qPCR

Phase	Dauer (s)	Endtemperatur (°C/s)	Temperaturveränderung (°C/s)	Zyklenzahl
Aktivierung	600	95	20	1
Amplifikation	10 (Denaturierung)	95	20	40-45
	3-5 (Annealing)	60-65	20	40-45
	3-5 (Elongation)	72	20	40-45
Schmelzkurve	0	95	20	1
	60	60	20	1
	0	95	0,1	1
Abkühlung	30	40	20	1

Tabelle 17: Variationen der Bedingungen der eingesetzten Primer in der Amplifikationsphase

Primer	β-Actin		Kollagen IV		Laminin 1	
	Dauer (s)	Endtemp. (°C/s)	Dauer (s)	Endtemp. (°C/s)	Dauer (s)	Endtemp. (°C/s)
Denaturierung	10	95	10	95	10	95
Annealing	3	65	3	65	3	65
Elongation	4	68	3	72	4	72
Primer	Laminin 5		Keratin 13		Keratin 14	
Phase	Dauer (s)	Endtemp. (°C/s)	Dauer (s)	Endtemp. (°C/s)	Dauer (s)	Endtemp. (°C/s)
Denaturierung	10	95	10	95	10	95
Annealing	5	60	3	65	3	65
Elongation	4	72	3	72	3	72

Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung erfolgte mit einer Software (Relative Quantification Software 1.0, Roche), wobei die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA anhand des Zyklus, bei dem die PCR-Reaktion aus der Hintergrundfluoreszenz (threshold) des SYBR Green I tritt, bestimmt wird. Die zugehörige Zyklusnummer wird als „*crossing point*“ (Cp) bezeichnet. Bei der PCR handelt es sich um eine exponentielle Amplifikation der Ausgangsmenge, die mathematisch mit der Formel 3 beschrieben werden kann.

Formel 3: PCR-Gleichung

$$N = N_0 \times E^{Cp}$$

N = Anzahl der cDNA-Kopien nach n Zyklen

N_0 = initiale Anzahl der cDNA-Kopien

E = PCR-Effizienz

Cp = *crossing point*

Dabei ist die entstehende Anzahl an cDNA-Kopien die Funktion der eingesetzten Kopienzahl N_0 , der PCR-Effizienz E und dem gemessenen „*crossing point*“ Cp, dem Punkt an dem die exponentielle Phase der Reaktion startet.

Die PCR-Effizienz ist unter idealen Bedingungen zwei. Sie ist jedoch von verschiedenen Faktoren wie die Ausgangskonzentration des Templates, Qualität der cDNA, Dauer der PCR-Reaktion, Effizienz der Polymerase, Nucleotidkonzentration sowie Primersequenz und Primerlänge abhängig und muss für jedes untersuchte Gen mit Hilfe von Standardkurven neu bestimmt werden. Dazu wurden 5 Verdünnungsstufen einer cDNA-Probe (4-fach Bestimmung) eingesetzt und die Effizienz mit Formel 4 berechnet.

Formel 4: PCR-Effizienz

$$E = 10^{-1/m}$$

E = PCR-Effizienz

m = Steigung der Standardkurve

Die Endgültige relative Ratio stellt eine Division der *crossing points* von Ziel- und Referenzgen dar. Um Ungenauigkeiten, z. B. beim Pipettieren, auszugleichen wurden die Werte der zu untersuchenden Gene doppelt bestimmt und die Mittelwerte der Ergebnisse zur relativen Quantifizierung verwendet, wobei zusätzlich eine Normalisierung auf einen Kalibrator erfolgte. Die zu untersuchenden Zielgene wurden mit einem Kalibrator verglichen, um Schwankungen der verschiedenen PCR-Läufe auszugleichen (Formel 5).

Formel 5: Kalibrator-normalisierte relative Ratio einer RTqPCR

$$\text{relative Ratio} = \frac{Cp \text{ Zielgen (Probe)} \div Cp \text{ Referenzgen (Probe)}}{Cp \text{ Zielgen (Kalibrator)} \div Cp \text{ Referenzgen (Kalibrator)}}$$

5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms IBM SPSS Statistics 18. Zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurden deskriptive Statistiken aus Mittelwerten und Standardabweichungen erstellt. Aufgrund der kleinen Versuchsgruppen ($n = 3 - 8$) zeigte sich vereinzelt eine hohe Streubreite, die auch durch die Verwendung primärer Zellen und damit durch individuelle Unterschiede der einzelnen Spender erklärt werden kann. Die Signifikanz wurde bei Normalverteilung mit dem unabhängigen bzw. abhängigen, zweiseitigen t-Test ermittelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt 5 % ($p = 0,05$).

VI. Ergebnisse

1. Etablierung der Isolation und Kultur primärer humaner Zellen der Oralmukosa

1.1 Isolation von Fibroblasten und Keratinozyten

Die Isolation von primären Fibroblasten und Keratinozyten erfolgte mit den unter V 1.1.1 und V 1.1.2 beschriebenen Methoden. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert. Je nach Größe der Mundschleimhautprobe konnten pro Probe jeweils 2 - 3 Schalen mit je ca. 10 - 15 Dermis-Explantaten zur Fibroblastenkultur und 2 Schalen mit je ca. 10 - 15 Epidermis-Explantaten für die Keratinozytenkultur angelegt werden. Dabei zeigte sich, dass Fibroblasten im Durchschnitt nach 5 - 6 Tagen beginnen, aus den Explantaten heraus zu wachsen (Abbildung 25 a). Sie waren an ihrer typisch spindelförmigen Morphologie zu erkennen. Die Keratinozyten begannen etwas früher zu wachsen, nämlich 3 - 4 Tage nach Explantation (Abbildung 25 b). Diese besitzen eine pflastersteinartige Morphologie.

Die Ernte der Fibroblasten erfolgte im Durchschnitt nach 18 Tagen, es wurde eine Zellzahl von durchschnittlich $1E6$ Zellen aus 2 - 3 Schalen erzielt. Die Keratinozyten wurden im Schnitt nach 25 Tagen geerntet. Hier lag die durchschnittliche Ausbeute bei ca. $3,5E6$ Zellen pro Schale.

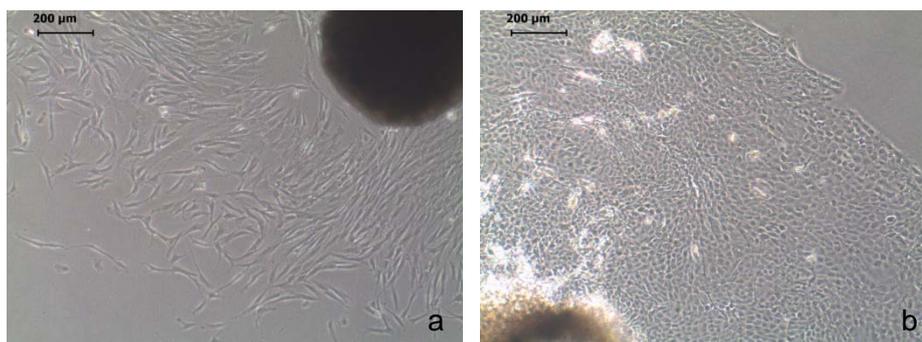


Abbildung 25:
Phasenkontrastaufnahme von primären Fibroblasten (a) und Keratinozyten (b)
beim Auswachsen aus dem Explantat
Vergrößerung: 40 x

Die erste Zellernte ergab beim enzymatischen Ablösen der Keratinozyten mit Alfasyme nicht wie bei Fibroblasten sofort eine homogene Zellsuspension, sondern ein „Häutchen“ aus zusammenhängenden Zellen. Es war daher ein weiterer Verdau mit dem Enzym Dispase II (2,4 U) nötig, um Einzelzellen in Suspension zu erhalten.

Eventuelle Kontaminationen der Fibroblasten-Kulturen mit Keratinozyten ließen sich durch einmaliges Abschaben der unerwünschten Zellart mit einem Zellscraper beheben. Die Elimination von kontaminierenden Fibroblasten in Keratinozyten-Kulturen wurde durch Abschaben der unerwünschten Zellart oder durch Versene-Behandlung erreicht.

Diese Prozedur musste bei starkem Befall vor jedem Mediumwechsel wiederholt werden, um Reinkulturen der Zellen in den Folgepassagen zu erhalten.

Um das Auswachsen der Keratinozyten genauer zu untersuchen, wurden Versuche im Chamber-Slide System (8-Well) durchgeführt. In jedes Well wurde je ein Epidermis-Explantat gelegt und in 500 µl Medium kultiviert. Da festgestellt werden sollte wie und an welchen Stellen die Keratinozyten wachsen wurden die herauswachsenden Zellen mit dem Proliferationsmarker Ki67 immunhistochemisch gefärbt. Dieser Marker färbt gezielt die Zellen an, die sich gerade teilen, da das Antigen Ki67 nur in der G1-, S-, G2- und in der M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, in ruhenden Zellen dagegen nicht.

Bei der Färbung zeigte sich, dass die Keratinozyten besonders an den Randbereichen der Kultur (Abbildung 26 a - c) und dem Bereich des Explantates (Abbildung 26 d - f) proliferieren. Jedoch gab es auch Wachstumsherde in mittleren Bereichen, allerdings nur in Regionen, in denen die Zellen einschichtig und noch nicht sehr dicht vorlagen. In mehrschichtigen Bereichen stagnierte das Wachstum.

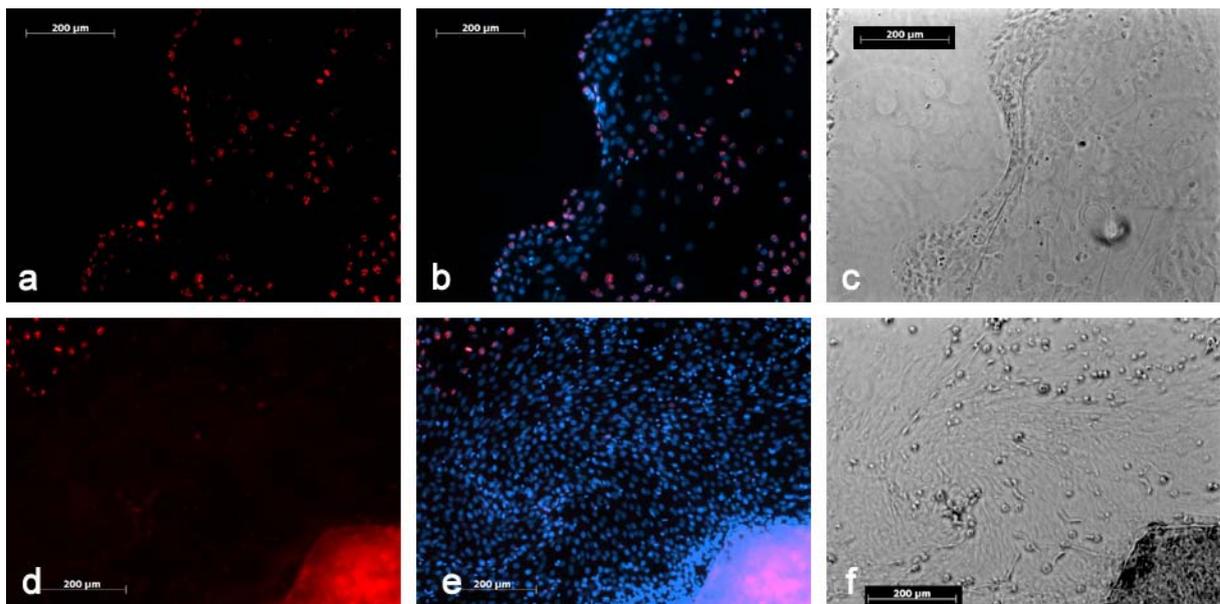


Abbildung 26:

Keratinozyten beim Auswachsen aus dem Explantat; Vergrößerung: 100 x. Fluoreszenzfärbung von Ki67 (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. a - c zeigt das Keratinozytenwachstum im Randbereich der herauswachsenden Keratinozyten, d - f im Bereich des Explantates

1.2 Kultivierung der Zellen

1.2.1 Kultivierung von Fibroblasten

Wachstumsmedium:

Um ein gutes Wachstumsmedium für Fibroblasten zu finden wurden zwei verschiedene Medien getestet: DMEM und DMEM/F12.

Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von $2,5E3$ Zellen/cm² in 24-Well Platten in beiden Medien ausgesät und die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählgerätes nach 4, 7, 14 und 21 Tagen bestimmt. Die Werte wurden als Wachstumskurven dargestellt (n = 3).

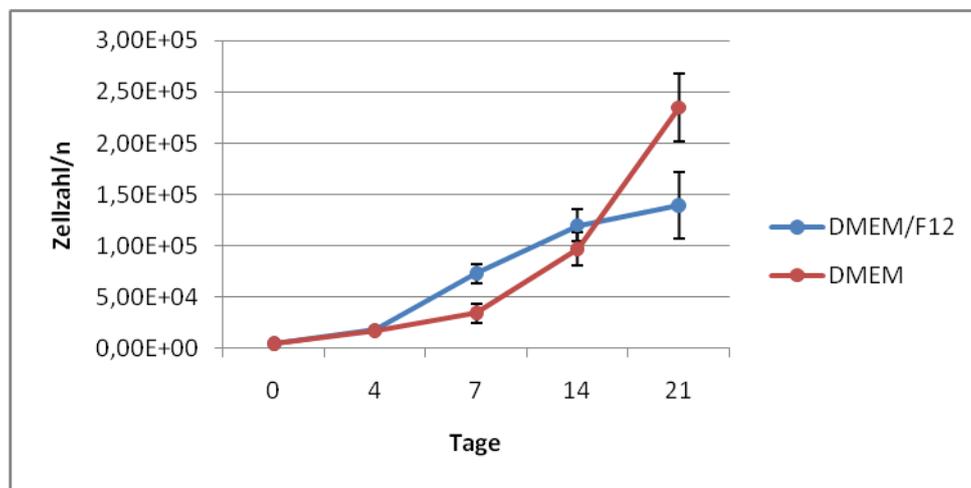


Abbildung 27:
Wachstumskurven von Fibroblasten in DMEM und DMEM/F12 Medium nach Zellzählung an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach Aussaat (n = 3)

Die Messungen ergaben, dass die Fibroblasten in beiden Medien gut wachsen können, in DMEM/F12 Medium jedoch schneller als in DMEM Medium. Dies war besonders nach 7- bzw. 14-tägiger Kultur zu erkennen. Gegen Ende des Versuchszeitraumes waren jedoch mit einer Zellzahl von $2,4E5$ gegen $1,3E5$ deutlich mehr Zellen pro Well in DMEM Medium gewachsen als in DMEM/F12 Medium (Abbildung 27).

Da es allerdings erwünscht ist in geringer Kulturzeit möglichst viele Zellen zu erhalten, wurde das DMEM/F12 Medium für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zu verwendet.

WST-1 Assay:

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde ein WST-1 Assay durchgeführt, ein kolorimetrischer Test mit dem man die metabolische Zellaktivität messen kann. Dazu wurden ebenfalls $2,5 \times 10^3$ Zellen/cm² in 24-Well Platten in DMEM und DMEM/F12 Medium ausgesät und der Assay nach 4, 7, 14 und 21 Tagen durchgeführt (n = 4 - 5).

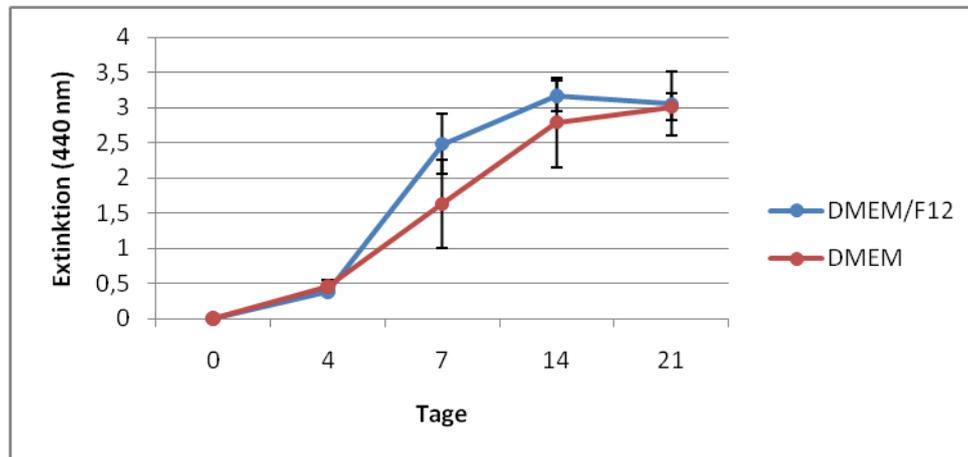


Abbildung 28:
Wachstumskurven von Fibroblasten in DMEM und DMEM/F12 Medium nach WST-1 Messung an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach Aussaat (n = 4 - 5)

Hier zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Zellzählung. Auch die verschiedenen Phasen der Wachstumskurve (Anlaufphase, Exponentielle Phase, Stationäre Phase und Absterbephase) waren deutlich zu erkennen. Fibroblasten wuchsen zunächst schneller in DMEM/F12 Medium (nach 7 bzw. 14 Tagen) und wurden erst nach einer Kulturzeit von 21 Tagen von den in DMEM gewachsenen Zellen eingeholt. In diesem Fall sieht es so aus als würde der Zyklus einer Wachstumskurve in DMEM/F12 Medium schneller durchlaufen als in DMEM Medium. Das Wachstumsoptimum wurde eher erreicht, gefolgt von der Absterbephase, die bei den Zellen in DMEM Medium nach 21 Tagen Kulturzeit noch nicht eintrat (Abbildung 28).

Auch dieses Ergebnis zeigt, dass DMEM/F12 Medium für die Versuche in dieser Arbeit besser geeignet ist, da die Zellen in kurzer Zeit schneller wachsen können als in DMEM Medium.

1.2.2 Kultivierung von Keratinozyten

Wachstumsmedium:

Um gute Wachstumsbedingungen für Keratinozyten zu finden, wurden die Zellen in den Medien DMEM, DMEM/F12 und KGM in einer Dichte von $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde 7 Tage lang im Mikroskop verfolgt und durch Fotos dokumentiert.

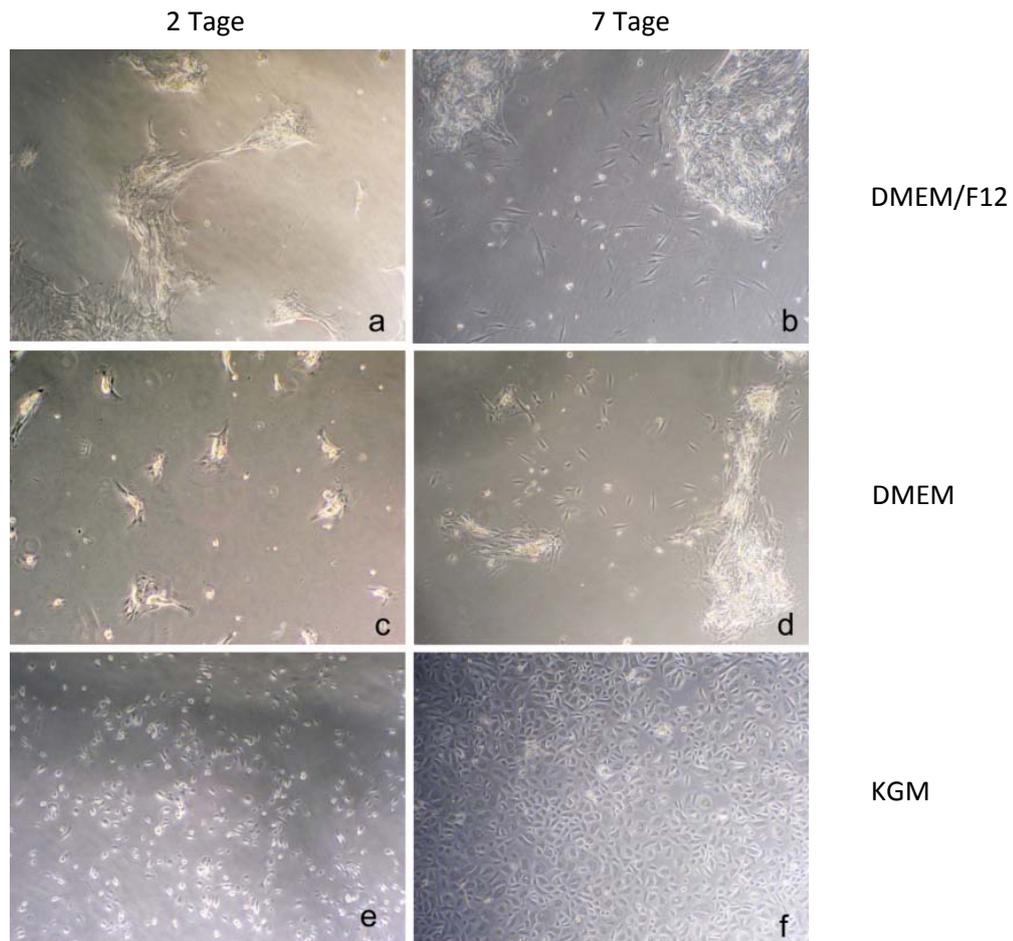


Abbildung 29:
Keratinozyten in DMEM/F12 (a, b), DMEM (c, d) und KGM (e, f) für 2 (a, c, e) und 7 (b, d, f) Tage. Nur in KGM können die Zellen wachsen und sich vermehren (e, f). Nach 7d in KGM sind die Keratinozyten konfluent (f). In DMEM/F12 und DMEM verklumpen die Zellen. Sie vermehren sich nicht (a - d). Vergrößerung: 40 x

Es zeigte sich, dass die Keratinozyten in DMEM und DMEM/F12 Medium nicht wachsen konnten, sondern bereits nach 2 Tagen verklumpt in den Schalen vorlagen (Abbildung 29 a, c). Dies änderte sich auch bei längerer Kulturzeit von 7 Tagen nicht. Lediglich einzelne Fibroblasten, die noch zwischen den Keratinozyten vorhanden waren begannen zu wachsen (Abbildung 29 b, d). Anders war dies bei der Kultur in KGM Medium. Hier lagen die Zellen nach 2 Tagen einzeln und unverklumpt in den Kulturschalen vor (Abbildung 29 e). Nach einwöchigem Wachstum waren sie konfluent (Abbildung 29 f).

Deshalb wurde in den folgenden Versuchen KGM als Wachstumsmedium für Keratinozyten eingesetzt.

Kulturschalen:

In der Literatur wird von gutem Keratinozytenwachstum auf Kulturschalen berichtet, die mit verschiedenen Proteinen der ECM, wie verschiedene Kollagene, Laminin oder Fibronectin beschichtet waren (Arenholt-Bindslev et al., 1987, Gilchrest et al., 1980, Karasek and Charlton, 1971, Tomakidi et al., 1997).

Um eine höhere Keratinozyten-Ausbeute in möglichst kurzer Kulturzeit zu erhalten wurden daher Keratinozyten in einer Dichte von $5E3/cm^2$ auf Kollagen I-beschichtete Kulturschalen (\varnothing 3,5 cm) ausgesät und mit Zellen auf unbeschichteten Schalen verglichen. Die Zellen wurden 7 Tage lang in KGM Medium kultiviert und das Ergebnis durch Fotos bei 40-facher Vergrößerung dokumentiert.

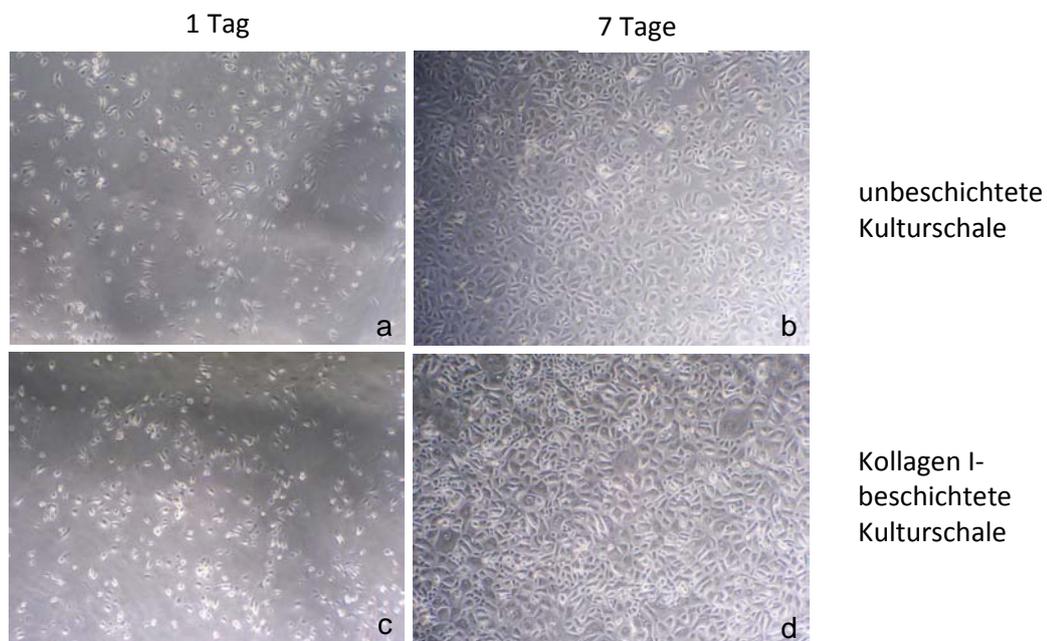


Abbildung 30:
Keratinozyten in KGM auf unbeschichteten Kulturschalen (a, b) und Kollagen I-beschichteten Kulturschalen (c, d) nach 1d (a, c) bzw. 7d (b, d) Kulturzeit. Es ist kein Unterschied beim Keratinozytenwachstum auf beschichteten bzw. unbeschichteten Kulturschalen zu erkennen. Vergrößerung: 40 x

Weder nach einem Tag noch nach 7 Tagen waren Unterschiede im Zellwachstum zu erkennen. Auf beiden Oberflächen hafteten nach der Aussaat ungefähr gleich viele Zellen an den Schalen (1 d) (Abbildung 30 a, c). Beide Schalen waren nach 7 Tagen konfluent bewachsen (Abbildung 30 b, d).

Auf die Verwendung von beschichteten Schalen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit verzichtet, da die Keratinozyten ebenso gut auf unbeschichteten Kulturschalen wachsen können.

Differenzierungsmedium:

Wie in III 1.2.1 (Differenzierung und Keratinisierung) beschrieben wurde, durchlaufen Keratinozyten ein Differenzierungsprogramm, während sie die verschiedenen Schichten des Epithels von basal nach apikal passieren. Dabei kommt es zu morphologischen sowie biochemischen Veränderungen der Zellen.

Um dies *in vitro* zu erreichen, bedarf es eines bestimmten Differenzierungsmediums. Laut Literaturangaben (Izumi et al., 1999, Moharamzadeh et al., 2008) muss dieses Medium verschiedene Wachstumsfaktoren und eine erhöhte Kalziumkonzentration im Vergleich zum Wachstumsmedium beinhalten. In Anlehnung an (Moharamzadeh et al., 2008) wurde in dieser Arbeit Green`s Medium (GM) verwendet. Hier sind die Wachstumsfaktoren EGF, Hydrocortison, Adenin, Insulin, Transferrin und Triiodothyronin enthalten (siehe III 4.). Die Kalziumkonzentration beträgt 1,72 mM und ist somit deutlich höher als beim Wachstumsmedium KGM mit 0,15 mM.

Bei konfluenter Aussaat der Keratinozyten (5E5 Zellen/cm² in einem 8-Well Chamber-Slide) in GM waren morphologisch schon nach einem Tag deutliche Unterschiede zum Wachstum der Zellen in KGM zu erkennen (Abbildung 31).

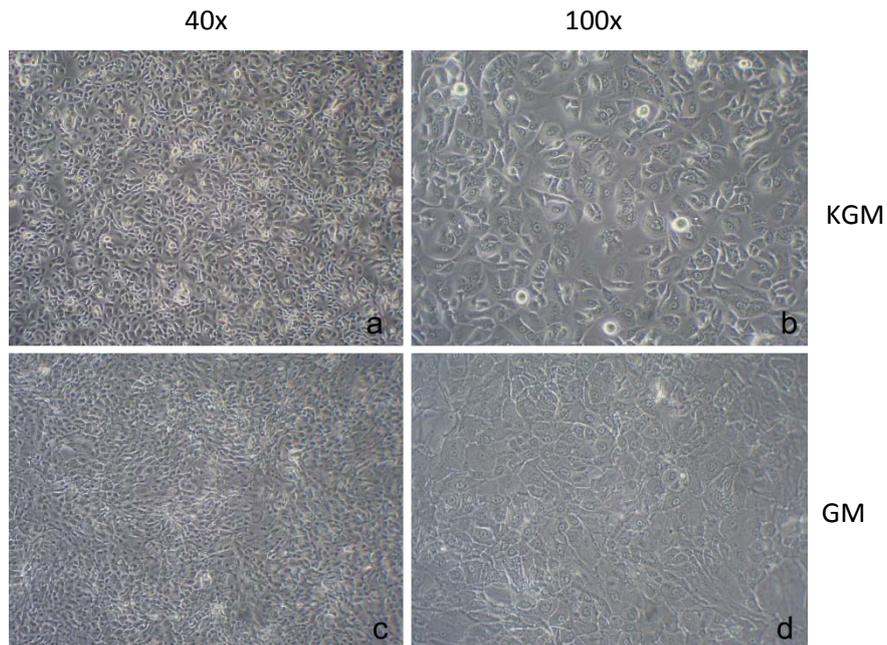


Abbildung 31:
Konfluente Keratinozyten in KGM (a, b) und GM (c, d) aufgenommen in den Vergrößerungen 40 x (a, c) und 100 x (b, d)

In KGM zeigten sich deutlichere Zellgrenzen als in GM. In GM waren die Zellen dagegen enger miteinander vernetzt und hatten mehr Zell-Zellkontakte. Wurden die Keratinozyten in niedrigeren Konzentrationen ausgesät wuchsen die Zellen in KGM in wenigen Tagen bis zur Konfluenz. In GM dagegen blieben scharf abgegrenzte Löcher im Zellrasen (Abbildung 33 b). Zellen, die in KGM gewachsen waren, ließen sich gut mit Trypsin/EDTA von den Kulturschalen lösen und passagieren. Sie lagen als homogene Zellsuspension vor. Zellen die in GM gewachsen waren ließen sich dagegen nicht als Einzelzellen mit Trypsin/EDTA von den Kulturschalen lösen, sie blieben aneinander haften und ließen sich nicht noch einmal aussäen.

Die *in vitro* Differenzierung der Keratinozyten in GM konnte mittels RT-qPCR bestätigt werden. Dazu wurden jeweils 2E6 Zellen in Ø 6 cm Kulturschalen in GM bzw. KGM ausgesät, so dass sie schon am ersten Tag nach der Aussaat konfluent waren. Die Zellen wurden nach einem und sieben Tagen geerntet und die Expression des Differenzierungsmarkers K13 für unverhornte orale Epithelien relativ zum Referenzgen β -Actin mittels RT-PCR bestimmt (n = 4).

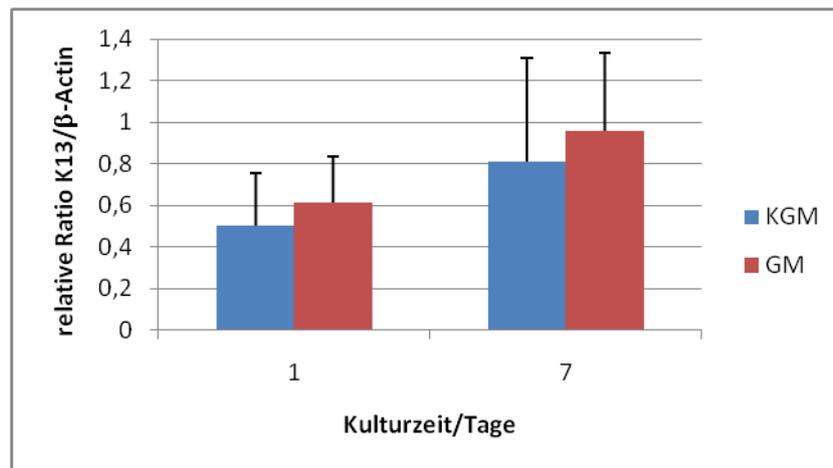


Abbildung 32:
Expressionslevel des Differenzierungsmarkers K13 relativ zum Referenzgen β -Actin in Keratinozyten, die in GM oder KGM gewachsen waren (n = 4)

Schon nach eintägigem Wachstum in GM war die Expression des Differenzierungsmarkers K13 im Vergleich zur Expression in KGM deutlich erhöht. Dieser Effekt war auch nach 7-tägiger Kulturzeit zu erkennen. Es zeigte sich, dass nach 7 Tagen die K13 Expression auch in KGM anstieg, jedoch in geringerem Ausmaß wie bei Zellen, die in GM gewachsen waren (Abbildung 32). Obwohl hier der Mittelwert der Kulturen in GM jeweils den Mittelwert der Kulturen in KGM überstieg, ließ sich über den unabhängigen, zweiseitigen t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen.

Optimierung des Differenzierungsmediums (ohne FCS)

Da ein Transplantat zum klinischen Einsatz entwickelt werden soll, ist die Verwendung von chemisch schlecht definierten tierischen Substanzen wie fetales Kälberserum (FCS) im Kulturmedium nachteilig. Es stellt eine Infektionsquelle dar und kann durch seine antigenen Eigenschaften allergische Reaktionen hervorrufen (Izumi et al., 2000, Eder and Falkner, 2009). Deshalb wurde versucht das Differenzierungsmedium auf einen Einsatz ohne FCS zu optimieren. Da eine erhöhte Kalziumkonzentration im Vergleich zum Wachstumsmedium die Differenzierung fördert, wurde dem Wachstumsmedium KGM CaCl_2 zugegeben und das Medium mit einer Konzentration von 1,8 mM CaCl_2 , wie sie bei Izumi et al., 1999 verwendet

wird, als Differenzierungsmedium getestet. Als weiteres Medium kam GM in Frage, dem anstelle von FCS 5%iges, humanes Serumalbumin, das am häufigsten vorkommende Plasmaprotein des menschlichen Blutes, hinzugefügt wurde. Da Izumi et al., 2000 berichteten, dass das FCS bei der Aussaat der Zellen ganz weggelassen werden kann, wurde in einem dritten Ansatz auf FCS in GM ersatzlos verzichtet.

Es wurden 5E4 Zellen pro 6-Well in den genannten Medien ausgesät und die Zellen nach 5 d durch Fotos bei 40-facher Vergrößerung dokumentiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz in GM.

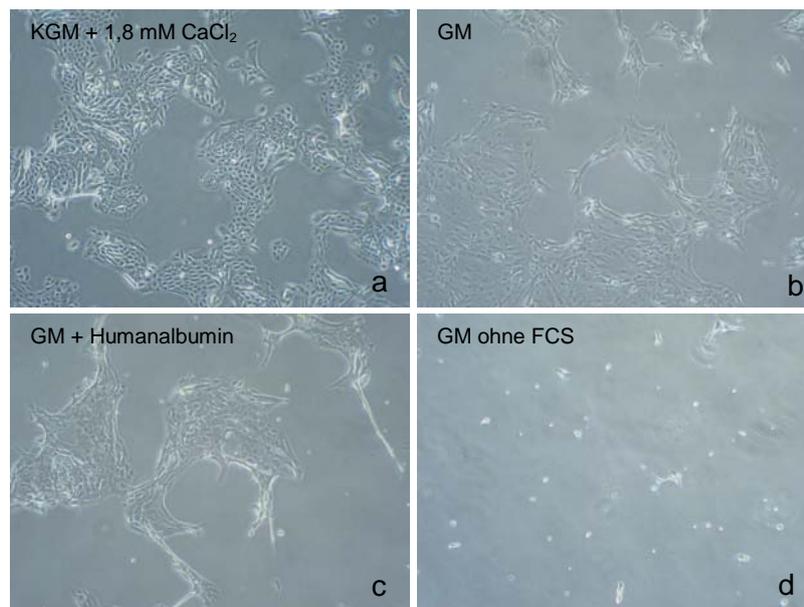


Abbildung 33:
Wachstum von 5E4 Keratinozyten pro 6-Well in den Differenzierungsmedien KGM + 1,8 mM CaCl₂ (a), GM (b), GM + Humanalbumin (c) und GM ohne FCS (d) nach 5 Tagen

Morphologie:

Morphologisch war das Zellwachstum in KGM + 1,8 mM CaCl₂ und GM + Humanalbumin dem Wachstum in GM ähnlich. In allen drei Medien wuchsen die Zellen bei nicht konfluenter Aussaat fleckenweise, hafteten stark aneinander und grenzten sich gegen ihre Umgebung deutlich ab. Lediglich in GM ohne FCS war kein Zellwachstum sichtbar (Abbildung 33).

Wachstumskurven:

Wurde das Wachstum von $5E4$ Zellen pro Well in 6-Well-Platten über 9 Tage hinweg ($n = 4$) durch Messungen der Zellzahl alle zwei Tage verfolgt, zeigte die Auswertung der Wachstumskurven, dass das Wachstum der Zellen in KGM + 1,8 mM $CaCl_2$ nach dem Wachstum im Wachstumsmedium KGM (Kontrolle) am besten war (Abbildung 34). Sie hatten zudem eine Morphologie, die den differenzierten Zellen in GM ähnelte, so dass dieses Medium für spätere Versuche der Transplantatherstellung getestet wurde (Abbildung 33 a). In VI 4 stellte sich jedoch heraus, dass die Keratinozyten in diesem Medium nicht fähig sind auf Scaffolds eine zusammenhängende Oberfläche auszubilden oder mehrere Schichten zu formen wie dies in GM gelingt. Auch Fibroblasten können in diesem Medium auf Scaffolds schlecht wachsen, da dieses Medium für Keratinozytenwachstum optimiert wurde. In GM wuchsen die Zellen in den Kulturschalen neun Tage lang kontinuierlich, jedoch langsamer als in KGM bzw. KGM + 1,8 mM $CaCl_2$. Humanes Serumalbumin eignete sich nicht als FCS-Ersatz in GM. Hier war wenig Wachstum zu erkennen. In GM ohne FCS konnten die Zellen nicht wachsen. Zu prüfen ist, ob bei einem klinischen Einsatz autologes Patientenserum aus Blut gewonnen werden und dies als Medium-Zusatz verwendet werden kann.

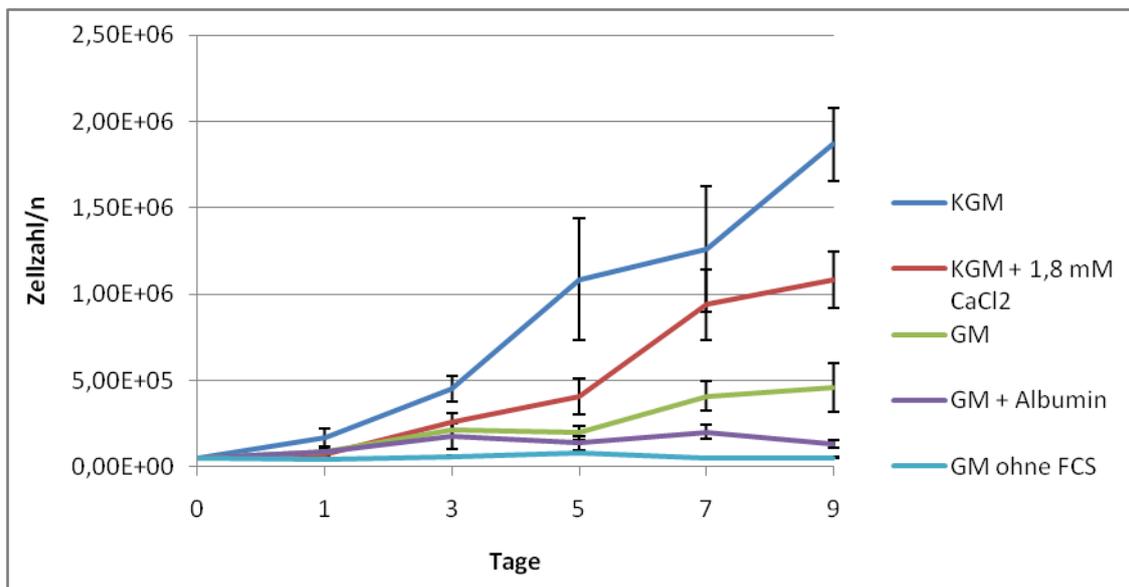


Abbildung 34:

Wachstumskurven von $5E4$ Keratinozyten pro 6-Well in unterschiedlichen Medien nach Messung an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 nach Aussaat ($n = 4$)

1.3 Charakterisierung der Zellen

1.3.1 Charakterisierung von Fibroblasten

1.3.1.1 Immunhistochemische Färbungen

Zur Charakterisierung der Fibroblasten wurden an 60 - 70 % konfluenten Zellen der ersten Passage immunhistochemische Färbungen von Proteinen durchgeführt, die als Marker für Gewebe mesenchymalen Ursprungs dienen.

Es eigneten sich Vimentin (grün) (Abbildung 35a, b) und CD 90 (Thy-1) (rot) (Abbildung 35 c, d). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.

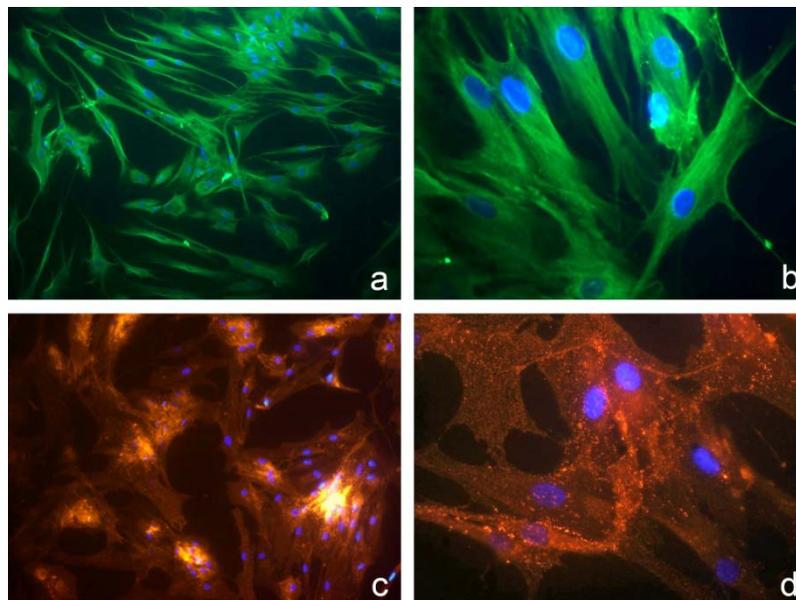


Abbildung 35:
Immunhistochemische Färbung von Fibroblasten gegen Vimentin (a, b) und CD 90 (c, d); Vergrößerungen: 100 x (a, c); 400 x (b, d). Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt

1.3.1.2 Replikationsverhalten und *in vitro* Alterung der Fibroblasten

Um das replikative Potential und die Alterung der Fibroblasten *in vitro* zu untersuchen wurden jeweils 2E5 Zellen verschiedener Spender in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm in DMEM/F12 Medium ausgesät und diese über mehrere Passagen hinweg bis zu einer Konfluenz von 80 – 90 % kultiviert (n = 5). Aus den Zellzahlen der geernteten Zellen wurden nach jeder Zellernte die „population doubling levels“ (PDLs) der Zellen bestimmt und diese kumulativ („cumulative population doubling levels“, CPDLs) als Diagramm dargestellt (Abbildung 36).

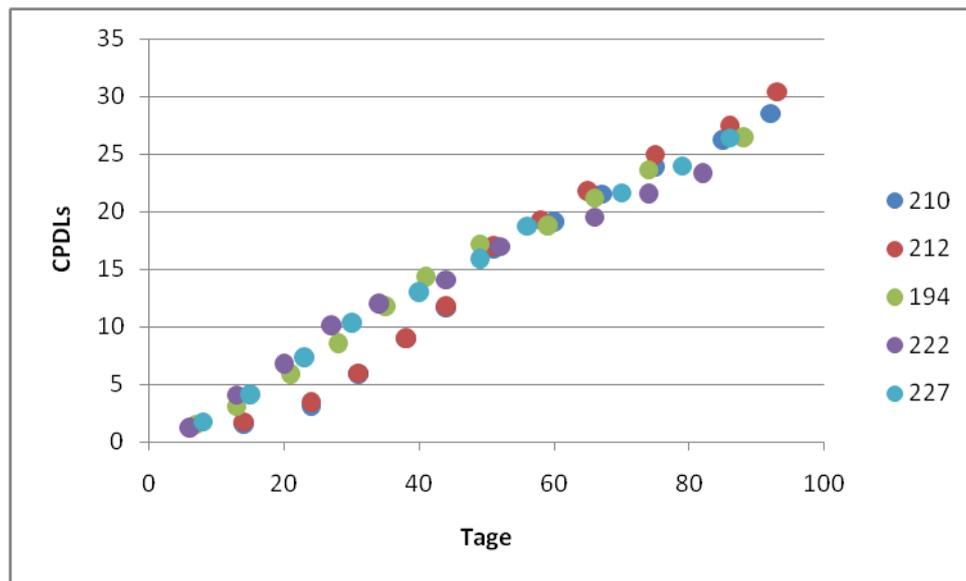


Abbildung 36:

Kumulative Darstellung der PDLs (CPDLs) von Fibroblasten im Verlauf der Zeit (n = 5). Fibroblasten konnten über 11 Passagen hinweg kultiviert werden, in einem Zeitraum von 90 Tagen. Dabei behielten sie ihr exponentielles Wachstumsverhalten bei und zeigten keine Seneszenz. Im betrachteten Zeitraum konnten CPDLs von 23 - 30 erreicht werden

Es war ein konstantes, exponentielles Wachstum über einen Zeitraum von 90 Tagen über durchschnittlich 11 Passagen hinweg zu erkennen. Der Zellzyklus wurde auch in hohen Passagen ganz und ähnlich schnell zu Ende geführt wie am Anfang. Im betrachteten Zeitrahmen war keine Seneszenz zu erkennen. In diesem Versuch wurden CPDLs von 23 - 30 erreicht, was jedoch nicht das Limit für primäre Fibroblasten darstellt. Auch morphologisch unterschieden sich Fibroblasten der Passage 1 nicht von Fibroblasten der Passage 11. Sie könnten also auch in späten Passagen noch für Versuche eingesetzt werden. Da es jedoch ein Ziel war Transplantate aus isolierten Zellen möglichst schnell zu konstruieren, wurden die Zellen in den Versuchen dieser Arbeit maximal in Passage 2 verwendet.

1.3.2 Charakterisierung von Keratinozyten

1.3.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Auch 60 - 70 % konfluente Keratinozyten der ersten Passage konnten mittels immunhistochemischer Färbungen charakterisiert werden. Hier wurden Färbungen der Proteine Keratin 5 (rot) und Keratin 14 (grün) als Marker basaler Epithelien durchgeführt. Die Zellkerne wurden wiederum mit DAPI blau angefärbt.

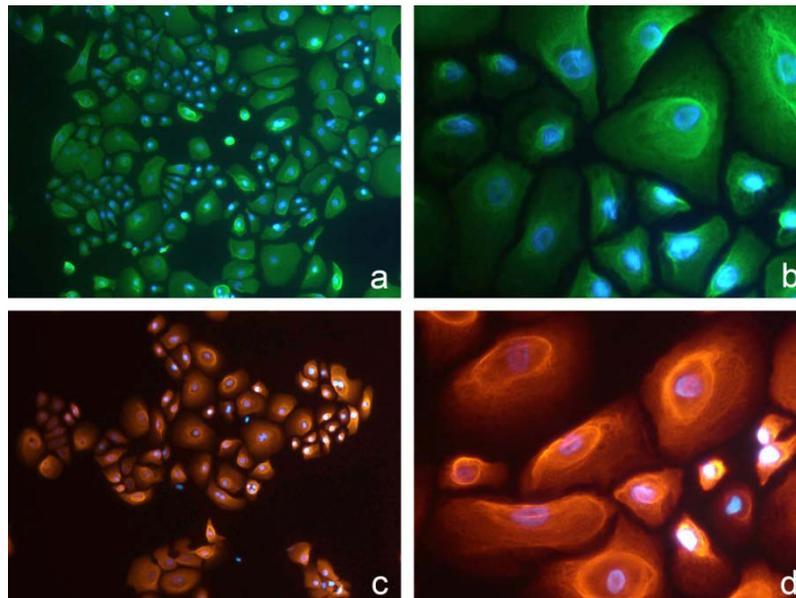


Abbildung 37:
Immunhistochemische Färbung von Keratinozyten gegen Keratin 14 (a, b) und Keratin 5 (c, d); Vergrößerungen: 100 x (a, c); 400 x (b, d). Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt

Die Anfärbung gelang mit beiden Markern für basale Epithelzellen. Auch die pflastersteinartige Morphologie der Zellen ist gut zu erkennen (Abbildung 37).

1.3.2.2 Replikationsverhalten und *in vitro* Alterung der Keratinozyten

Auch für Keratinozyten wurde das replikative Potential und die Zellalterung *in vitro* untersucht. Dazu wurden jeweils 1E6 Zellen verschiedener Spender in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm in KGM ausgesät und diese über mehrere Passagen hinweg bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert, bis zu einem Wachstumsstopp ($n = 6$). Aus den Zellzahlen der geernteten Zellen wurden nach jeder Zellernte die PDLs der Zellen bestimmt und diese kumulativ (CPDLs) als Diagramm dargestellt (Abbildung 38).

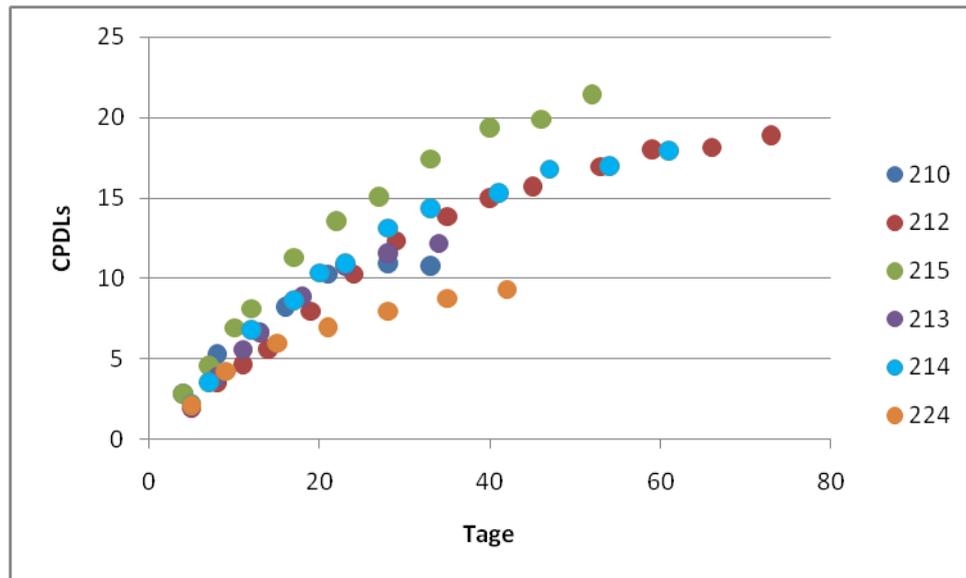


Abbildung 38:

Kumulative Darstellung der PDLs (CPDLs) von Keratinozyten im Verlauf der Zeit ($n = 6$). Keratinozyten konnten über 7 - 15 Passagen hinweg kultiviert werden, in einen Zeitraum von bis zu 73 Tagen. Dabei zeigten sie in den ersten 4 - 5 Passagen exponentielles Wachstum. Es folgte eine Phase der mit langsamem Wachstum (senescente Phase) bis zum Wachstumsstopp (Seneszenz). Es konnten CPDLs von 9 - 21 erreicht werden

Dabei zeigte sich, dass Keratinozyten über 7 - 15 Passagen hinweg kultiviert werden konnten, in einen Zeitraum von bis zu 73 Tagen. Es wurden CPDLs von 9 - 21 erreicht. In den ersten 4 - 5 Passagen war exponentielles Wachstum zu erkennen, gefolgt von einer Phase der Seneszenz mit langsamem Wachstum bis zum Wachstumsstopp. Es sind deutliche Schwankungen der Zellqualität der einzelnen Proben zu erkennen. Zu prüfen ist welche Ursachen dafür verantwortlich sind, z. B. Alter der Spender oder der Gewebeursprung.

Tabelle 18: Proliferationspotential der einzelnen Keratinozytenkulturen verschiedener Spender

Spender	Geschlecht	Alter	CPDL _{max}
210	m	20	10,94
212	w	24	15,70
213	m	19	12,16
214	m	21	15,17
215	m	20	17,42
224	m	37	9,31

Auch morphologisch unterschieden sich Keratinozyten der frühen und späten Passagen. Zellen der frühen Passagen (1 und 2) waren klein und hatten eine polygonale Form. Zellen der späten Passagen (ab Passage 5) waren deutlich größer und enthielten runde, vakuolenartige Hohlräume im perinucleären Zytoplasma (Abbildung 39).

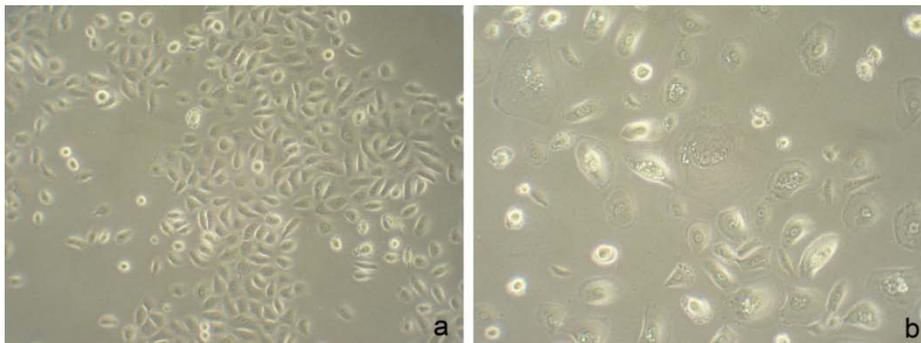


Abbildung 39:
Keratinozyten in der Passage 1 (a) und Passage 5 (b). Vergrößerung: 100 x. Zellen der Passage 1 sind klein und polygonal, Zellen der Passage 5 sind groß und enthalten runde, vakuolenartige Hohlräume

Dies war nicht nur im Mikroskop zu erkennen sondern auch mit dem Zellzählgerät detektierbar. Im Diagramm wird die Anzahl der Counts (CNT) gegen die Zellgröße in μm aufgetragen. Die Kurve der Zellen aus Passage 1 hat sein Maximum im Bereich der vitalen Zellen bei einer Zellgröße von $14 \mu\text{m}$. Das Maximum der Kurve von Zellen aus Passage 5 liegt bei $19 \mu\text{m}$ Zellgröße und ist somit deutlich nach rechts verschoben (Abbildung 40).

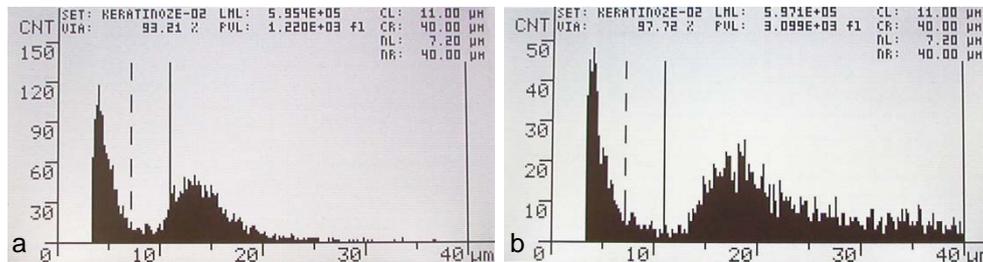


Abbildung 40:

Ergebnisse des Zellzählers CASY (Schärfe System) für Zellen der Passage 1 (a) und Zellen der Passage 5 (b). Im Diagramm wird die Anzahl der Counts (CNT) gegen die Zellgröße in μm aufgetragen. Das Maximum der Kurve von Zellen der Passage 1 liegt bei $14 \mu\text{m}$ Zellgröße, das Maximum der der Kurve von Zellen aus Passage 5 liegt bei $19 \mu\text{m}$

Da nur die frühen Passagen ein exponentielles Wachstum zeigten wurden die Zellen hauptsächlich in der ersten, maximal in der zweiten Passage für Versuche verwendet.

1.3.3 Vergleich des Replikationsverhaltens von Fibroblasten und Keratinozyten

Erst im direkten Vergleich des Replikationsverhaltens von Fibroblasten und Keratinozyten ist der große Unterschied beider Zellarten zu erkennen. Hier wurden die Mittelwerte von 5 Fibroblasten-Kulturen, siehe VI 1.3.1.2 und die Mittelwerte von 6 Keratinozyten-Kulturen, siehe VI 1.3.2.2 in einem Diagramm zusammengefasst (Abbildung 41).

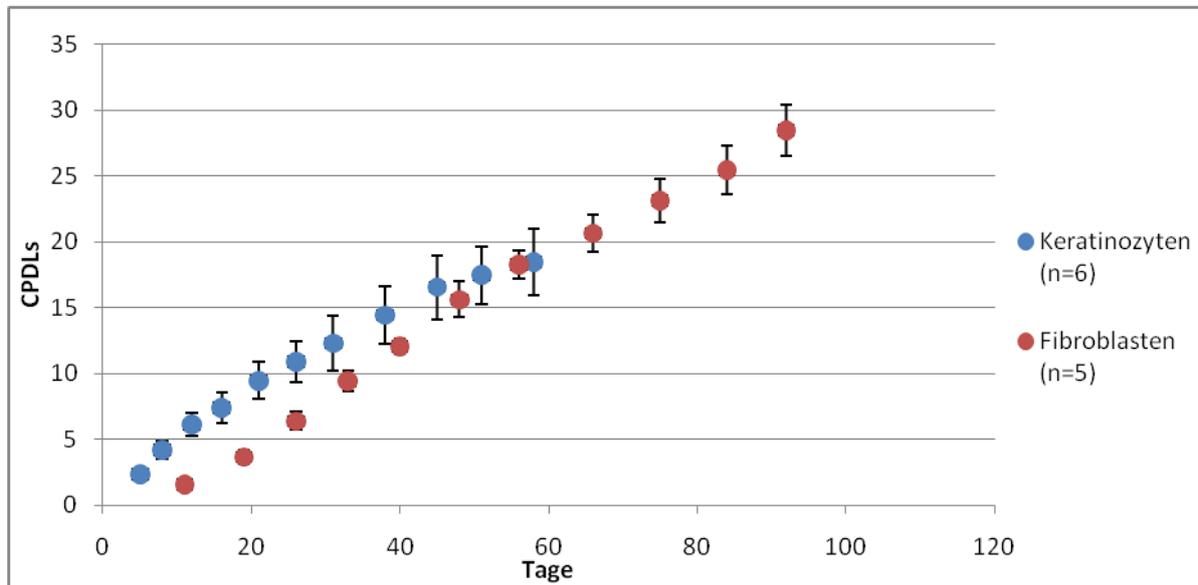


Abbildung 41:

Vergleich der CPDLs von Keratinozyten und Fibroblasten im Verlauf der Zeit. Keratinozyten konnten über durchschnittlich 11 Passagen hinweg kultiviert werden, in einen Zeitraum von durchschnittlich 50 Tagen. Dabei zeigten sie in den ersten 4 - 5 Passagen exponentielles Wachstum, das in ein seneszenzartiges Verhalten überging (Abflachung der Kurve bis zum Wachstumsstopp). Fibroblasten konnten in einem Zeitraum von durchschnittlich 90 Tagen über 11 Passagen kultiviert werden. Sie zeigten dabei ein konstantes exponentielles Wachstum

Während die Keratinozyten schneller wuchsen (steilere Kurve) als die Fibroblasten kamen sie nach durchschnittlich 11 Passagen und 50 Tagen in ein seneszenzartiges Stadium. Die Zellen konnten nicht mehr weiter wachsen, da der Zellzyklus nicht mehr ganz zu Ende geführt wurde. Dieser Effekt wurde nach ca. 5 Passagen sichtbar, als die Kurve abflachte, bevor sie zum Abbruch gelangte. Bei Fibroblasten dagegen war im betrachteten Versuchszeitraum von 90 Tagen über 11 Passagen ein konstantes exponentielles Wachstum ohne Seneszenz zu erkennen. Die Kurve behielt ihre Steigung, was ein durchweg exponentielles Wachstum der Zellen bedeutete.

1.4 Zellkultur von mikrovaskulären Endothelzellen (mvEC)

Da der Erfolg einer Transplantation auch von der Vaskularisierung eines Transplantats und damit der Anbindung an die Blutversorgung abhängt, sollten mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEC) isoliert werden, um diese als dritte Zellart in den Dermisteil des Transplantates mit einzubringen. Dazu wurde die in V 1.1.3 beschriebene Methode durchgeführt. Im Anschluss an die Zellisolation wurden alle isolierten Zellen in Kulturflaschen mit 25 cm² Kulturfläche ausgesät und diese im Brutschrank kultiviert (n = 4).

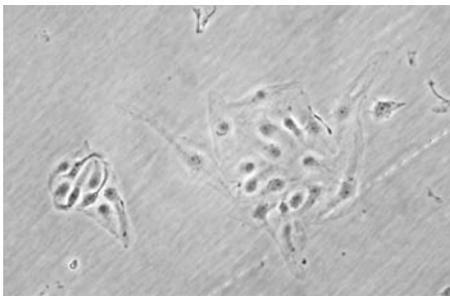


Abbildung 42:
Mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEC)
nach 3-tägiger Kulturzeit.
Vergrößerung 20 x

Tabelle 19: Anzahl der isolierten mvECs der einzelnen Spender

Spender	Anzahl der isolierten mvECs
158	1,577E5
163	6,836E5
166	3,663E4
183	1,324E5

In den Kulturflaschen zeigten sich nach drei Tagen vereinzelte Zellen, die morphologisch mikrovaskulären Endothelzellen entsprachen (Abbildung 42).

Die Menge an mvECs, die aus den gespendeten Mundschleimhautproben isoliert werden konnte war jedoch zu gering, so dass die Zellen nicht zur Konfluenz gelangen konnten. Es bildeten sich lediglich vereinzelte, kleine Kolonien aus, die aber nicht weiter wuchsen. Es war keine Passagierung sowie eine immunhistochemische Charakterisierung der Zellen möglich. Die Zellen wurden nicht zur Transplantatherstellung eingesetzt. Es ist vorstellbar den Versuch in Zukunft mit größeren Mundschleimhautproben, insbesondere einem größeren Dermisteil zu optimieren oder mvECs aus Blut zu isolieren.

2. Charakterisierung der verwendeten Scaffolds

2.1 Verhalten der Scaffolds in Zellkulturmedium

Im Anbetracht einer späteren Transplantation muss die Stabilität der resorbierbaren Scaffolds zum einen im Mundraum über eine gewisse Zeit bis zur Einheilung der Zellen gegeben sein, zum anderen muss das Scaffold auch während der *in vitro* Versuche unter Medieneinfluss stabil bleiben.

Für die hier vorliegende Arbeit ist im ersten Schritt eine Stabilität im Medium gefordert. Daher wurden alle verwendeten Materialien für 7 Tage in Zellkulturmedium unter Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, Luftfeuchtigkeit 90 %) inkubiert, um deren Stabilität zu testen.

Es zeigte sich, dass sich DRT, SIS und Vicryl im Medium über 7 Tage hinweg nicht verändern. TFE quillt zwar bis zu einem bestimmten Stadium auf, bleibt aber dennoch über den genannten Zeitraum stabil. Das PLA-Vlies zieht sich bei Kontakt mit dem Medium sofort zusammen und wird dadurch kleiner, hart und steif. Die Mediuminkubation der Alginat- und Hyalofill-F-Membran hat ein Auflösen der Membranen innerhalb weniger Stunden zur Folge.

Tabelle 20: Verhalten der Scaffolds in Zellkulturmedium

Nr.	Scaffold	Verhalten in Medium
1	TissuFoil E (TFE)	Membran quillt auf, wird weicher, bleibt aber stabil
2	Dermal Regeneration Template (DRT)	Membran bleibt stabil, verändert sich nicht in Medium
3	Vicryl	Membran bleibt stabil, verändert sich nicht in Medium
4	Small Intestinal Submucosa (SIS)	Membran bleibt stabil, verändert sich nicht in Medium
5	Polylaktid-Vlies (PLA-Vlies)	Membran zieht sich bei Kontakt mit Medium zusammen, wird bereits nach einem Tag hart und steif
6	Alginat-Membran	Membran löst sich in kurzer Zeit im Medium auf
7	Hyalofill-F	Membran löst sich in kurzer Zeit im Medium auf

Somit stellten sich die Membranen TFE, DRT, Vicryl und SIS als die geeignetsten Kandidaten zur Besiedelung mit Zellen heraus. Deshalb wurden die weiteren Untersuchungen und Versuche an und auf diesen Materialien durchgeführt. Da SIS erst im späteren Verlauf der Arbeit zur Verfügung stand wurden für die grundlegenden Versuche zur Konstruktion eines Mundschleimhauttransplantates zunächst TFE, DRT und Vicryl verwendet.

2.2 Untersuchung der Scaffold-Oberfläche mittels Elektronenmikroskopie

Die Oberflächenbeschaffenheit der Scaffolds ist eine wichtige Determinante für die geplante Besiedelung mit Zellen. Daher wurde zunächst eine elektronenmikroskopische Untersuchung der aussichtsreichen Scaffolds TFE, DRT und Vicryl ohne Zellbewuchs durchgeführt, um diese später mit besiedelten Membranen vergleichen zu können.

Die trocken gelagerten Membranen TFE und Vicryl wurden zuvor eine Stunde lang in Zellkulturmedium eingeweicht. DRT konnte direkt verwendet werden, da diese Membran feucht gelagert wird.

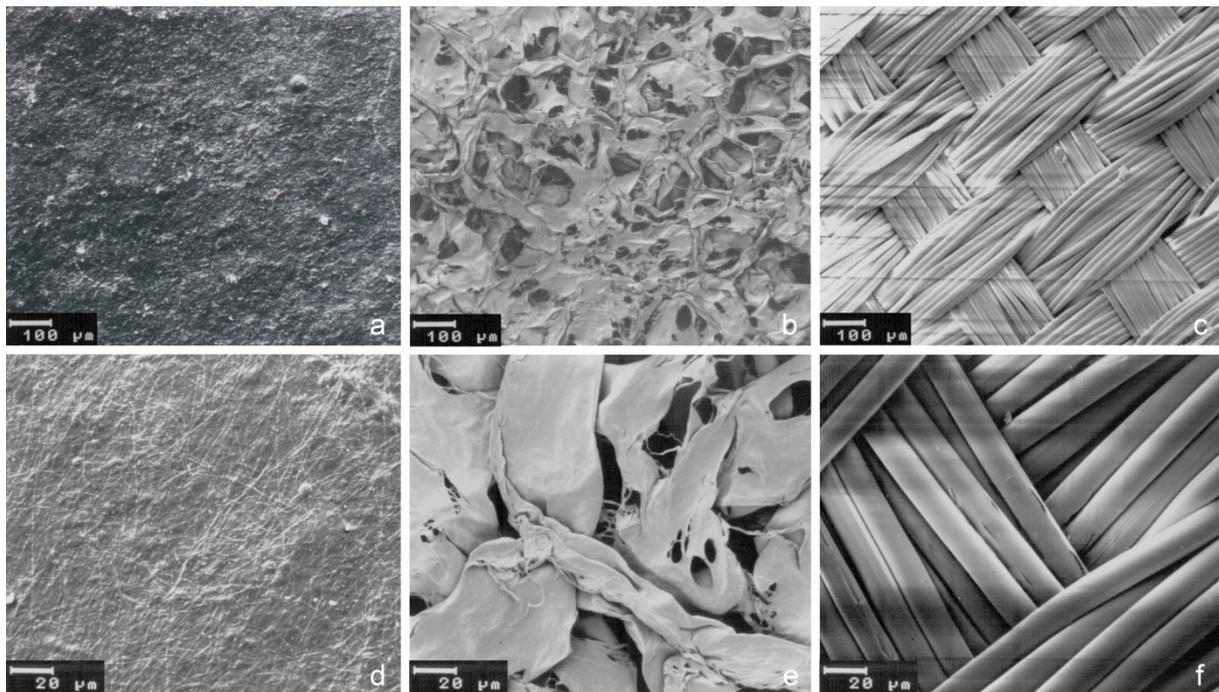


Abbildung 43:

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Oberfläche von TFE (a, d), DRT (b, e) und Vicryl (c, f). Vergrößerung: 100 x (a, b, c); 500 x (d, e, f). TFE hat eine glatte Oberfläche, DRT ist grobporig und Vicryl zeigt die Struktur eines gewebten Netzes

TFE zeigte unter dem Elektronenmikroskop eine glatte Oberfläche, bei 500-facher Vergrößerung sind einzelne Kollagen-Fasern zu erkennen (Abbildung 43 a, d).

Bei DRT ist eine grobporige Oberfläche zu erkennen. Das Scaffold zeigt große Lücken im Zusammenhalt der einzelnen Fasern (Abbildung 43 b, e).

Vicryl hat die typische Struktur eines gewebten Netzes ohne Zwischenräume zwischen den einzelnen Faserbündeln (Abbildung 43 c, f).

Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheiten kann auch von unterschiedlichem Wachstum der Zellen auf den Membranen ausgegangen werden.

2.3 Kryosektion der Scaffolds

Die Kryosektion ist eine Methode, um auf schnellem Weg einen optischen Eindruck der später konstruierten Mundschleimhautäquivalente zu bekommen. Anhand immunhistochemischer Färbungen an Kryoschnitten soll damit eine Proteinexpression z. B. von Differenzierungsmarkern oder Markern der Basallamina nachgewiesen werden. Deshalb ist es wichtig, dass diese Methode bei den verwendeten Scaffolds angewandt werden kann.

Dazu wurden die Membranen in Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura) eingebettet, eingefroren und mit dem Kryostaten geschnitten. Die trocken gelagerten Membranen TFE und Vicryl wurde zuvor wiederum eine Stunde lang in Zellkulturmedium eingeweicht. DRT und TFE ließen sich problemlos im Kryostaten schneiden (Abbildung 44 a, b). Eine korrekte Sektion der Vicrylmembran war schwieriger, da das Netz aus einzelnen Vicrylfasern nach der Bearbeitung zerfiel (Abbildung 44 c).

Trotz der Instabilität dieser Membran wurde sie in den folgenden Versuchen verwendet, da anzunehmen war, dass die aufgebrauchten Zellen die Fasern der Membran zusammenhalten und daher zukünftige Schnitte erfolgreich verlaufen würden.

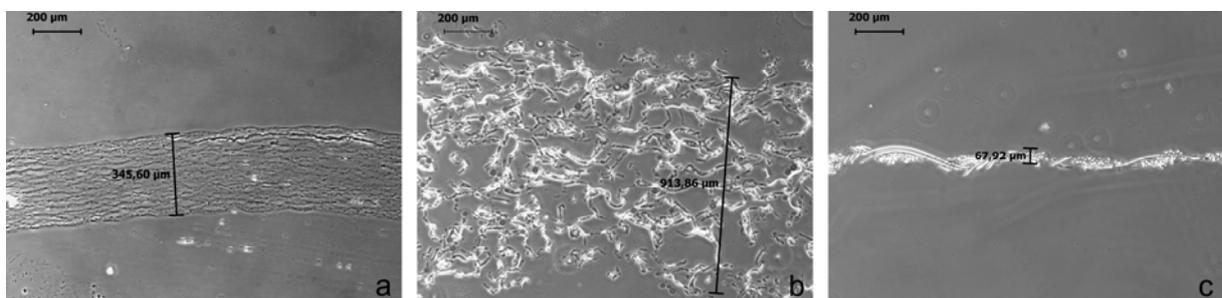


Abbildung 44:

Kryoschnitte der Membranen TFE (a), DRT (b) und Vicryl (c). Vergrößerung 40x. Die unterschiedliche Dicke und Beschaffenheit der einzelnen Scaffolds ist zu erkennen. Vergrößerung: 40 x

Die unterschiedliche Dicke und Porosität der verschiedenen Scaffolds war anhand der Kryoschnitte deutlich zu erkennen. DRT stellte mit 0,80 - 0,95 mm Dicke die dickste verwendete Membran dar. Wie auch schon die Oberflächenanalyse zeigte war dieses Scaffold sehr grobporig und enthielt viele Hohlräume.

TFE war mit 0,30 - 0,60 mm die zweitdickste Membran im Test. Die schon elektronenmikroskopisch gezeigte glatte Oberfläche war auch im Querschnitt gut zu erkennen. Die im Bild erkennbaren Hohlräume bieten jedoch Raum zum Einwachsen der Zellen.

Vicryl war mit 0,05 - 0,10 mm Dicke die dünnste verwendete Membran. Sie wies aufgrund ihrer geringen Stärke eine erwartungsgemäß kompakte Struktur auf und bietet daher wenig Raum für das Zellwachstum innerhalb der Membran.

Der Versuchsaufbau sah im ersten Versuchsschritt zur Entwicklung von Mundschleimhauttransplantaten (Oralmukosa-Äquivalente, OMÄs) die Aussaat von Fibroblasten auf Scaffolds und damit die Herstellung von Dermal-Äquivalenten (DÄs) vor.

3. Entwicklung von Dermal-Äquivalenten (DÄ) (Fibroblasten auf Scaffolds)

3.1 Verschiedene Zellzahlen

Um eine geeignete Zellzahl zur Entwicklung von Dermal-Äquivalenten zu finden wurden mit der in V 1.3.1 beschriebenen Methode Zellkonzentrationen von $1E5$, $2E5$ und $4E5$ Zellen pro cm^2 Kulturfläche auf die Scaffolds ausgesät. Das Wachstum wurde nach 4 und 7 Tagen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten kontrolliert.

3.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

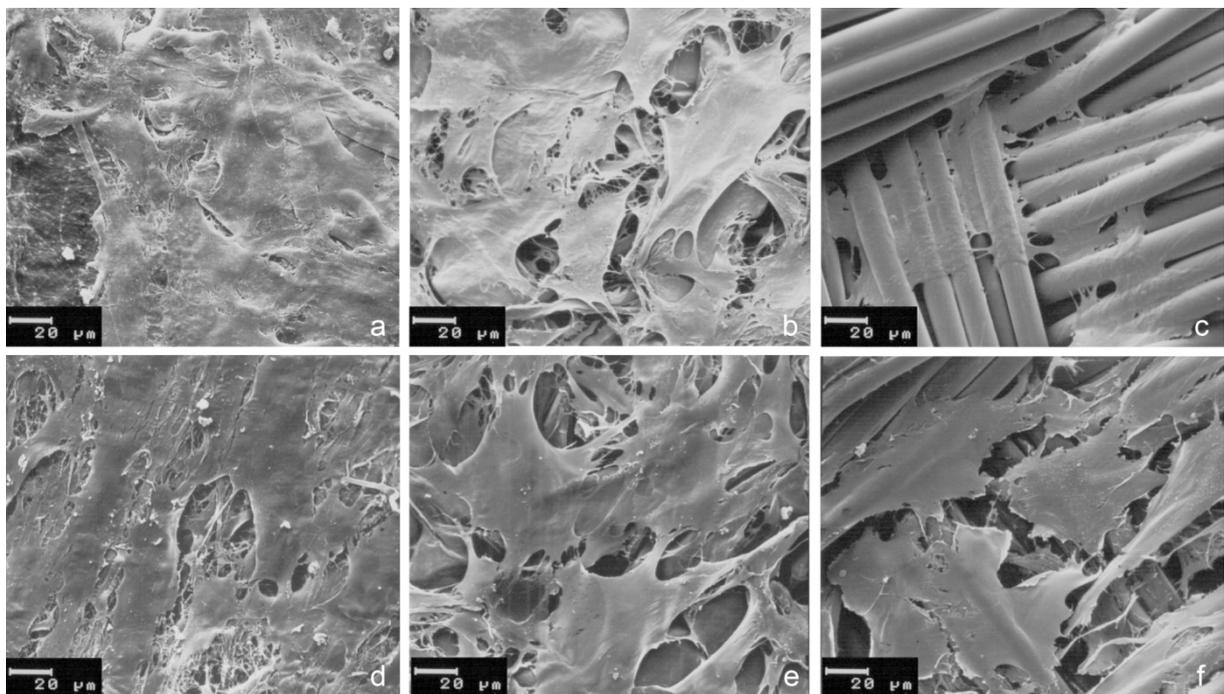


Abbildung 45:

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Oberfläche von TFE (a, d), DRT (b, e) und Vicryl (c, f) nach Besiedelung mit $1E5/cm^2$ Fibroblasten nach 4 (a, b, c) und 7 (d, e, f) Tagen Kulturzeit. Vergrößerung: 500 x

Fibroblasten zeigten auf allen verwendeten Scaffolds gutes Wachstum, wie das elektronenmikroskopische Bild beweist (Abbildung 45). Nach 4 Tagen Wachstum von $1E5$ Fibroblasten/ cm^2 wurde eine dünne Zellschicht sichtbar, die sich auf allen drei Membranen ausbreiten konnte. Die ursprüngliche Matrix war noch gut zu erkennen (Abbildung 45 a - c). Nach 7 Tagen waren die Membranen bereits so dicht bewachsen, dass die Scaffolds kaum noch zu erkennen waren (Abbildung 45 d - f). Die Oberflächenstruktur der bewachsenen Membranen unterschied sich jedoch. Auf Vicryl und DRT waren die Fibroblasten lockerer

angeordnet. Auf TFE dagegen war die Oberfläche sehr dicht bewachsen, ohne Lücken zwischen den Zellen. Alle drei Membranen waren damit biokompatibel.

3.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden 1E5, 2E5 und 4E5 Zellen pro cm² Kulturfläche auf TFE, DRT und Vicryl ausgesät. Nach 4 und 7 Tagen Kulturzeit wurden Kryoschnitte von den Präparaten hergestellt und im Anschluss eine Vimentin-Färbung zum Anfärben der Fibroblasten parallel mit einer DAPI-Färbung zum Anfärben der Zellkerne durchgeführt.

Nach 4-tägiger Kulturzeit waren bei allen verwendeten Zellkonzentrationen nur wenige Zellen auf den Scaffolds zu erkennen. Nach 7-tägiger Kulturzeit zeigten sich nun auch Unterschiede zwischen den einzelnen Zellkonzentrationen und Trägermaterialien.

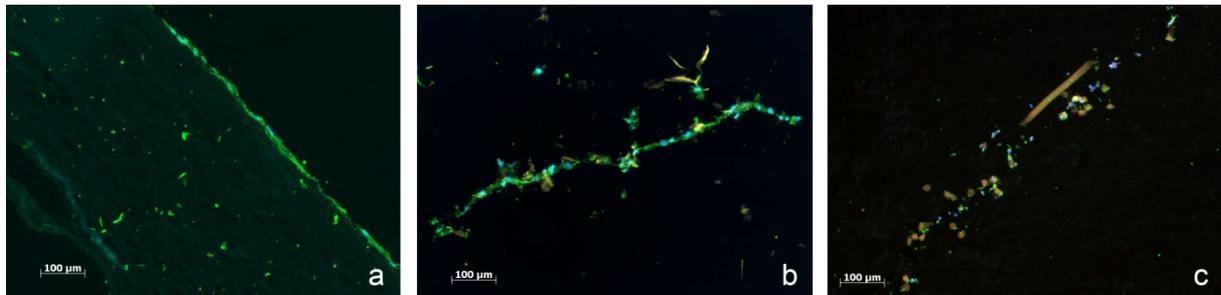


Abbildung 46:

7-tägige Kultivierung von 2E5 Fibroblasten/cm² auf TFE (a), DRT (b) und Vicryl (c). Immunhistochemische Färbung von Vimentin (grün), Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Vergrößerung: 100 x

Dabei stellte sich die Zellzahl von 1E5 Zellen/cm² Zellen als zu gering heraus. Es konnte selbst nach 7 Tagen kein gleichmäßiger Zellbewuchs auf den Membranen festgestellt werden. Das 7-tägige Wachstum von 2E5/cm² und 4E5/cm² ergab ähnliche Ergebnisse, nämlich die Bildung einer Fibroblasten-Schicht auf der Membran-Oberfläche. Dies konnte auf TFE besonders gut dargestellt werden, da die Membran sowohl bei der Kryosektion als auch beim Färbe-Vorgang auf dem Objektträger stabil blieb (Abbildung 46 a). Aber auch auf DRT konnte eine zusammenhängende Zellschicht nachgewiesen werden (Abbildung 46 b). Dies war bei Vicryl nicht möglich, da die einzelnen Fasern der Membran zunächst bei der Kryosektion und dem anschließenden Anfärben auseinander fielen. Es waren nur einzelne Zellfragmente und Vicryl-Stücke unter dem Mikroskop zu erkennen (Abbildung 46 c).

Da beim Einsatz von 2E5/cm² und 4E5/cm² kaum Unterschiede im Zellwachstum nach 7 Tagen auf den Unterlagen festzustellen waren, wurde die Zellzahl von 2E5/cm² für die weiteren Versuche ausgewählt, um eine möglichst große Fläche mit Fibroblasten besiedeln

zu können. Es zeigte sich, dass die Fibroblasten nur auf der Oberfläche, jedoch nicht in die Membran hinein wuchsen.

3.2 Verschiedene Aussaattechniken

Die Fibroblasten zur Bildung eines Dermal-Äquivalentes sollten nicht auf dem Zellträger, sondern in ihm wachsen. Es wurden verschiedene Aussaattechniken getestet, um den Fibroblasten ein Wachstum auch innerhalb der Scaffolds zu ermöglichen. Jeweils 2×10^5 Zellen/cm² wurden auf verschiedene Arten ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Die Auswertung fand an immunhistochemisch gefärbten Kryoschnitten (Vimentin) der Präparate statt.

Bei der ersten Methode wurde das Scaffold in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt, die Zellen in 1 ml Medium dazugegeben und alles bei 500 rpm für 3 min zentrifugiert. Bei einer zweiten Methode wurden die Zellen in Medium mit einer Vakuum-Pumpe durch das Scaffold gesaugt. Diese beiden Methoden wurden mit der in V 1.3.1 beschriebenen Methode verglichen (Methode 3), bei der die Zellen ohne weitere Behandlung in 500 ml Medium auf das Scaffold gegeben und mit einem Polystyrol-Rähmchen fixiert wurden.

Es zeigte sich, dass das Zellwachstum nach dem Ansaugen mit der Vakuum-Pumpe auf DRT und Vicryl negativ beeinflusst war. Auf oder im Scaffold waren kaum Zellen zu erkennen, auch im Kulturgefäß waren wenige Zellen im Umkreis des Scaffold sichtbar. Möglicherweise wurden die Zellen komplett durch den Zellträger gesaugt und gingen somit verloren. Bei TFE war ein Durchsaugen der Zellsuspension nicht möglich, da die Membran für die Flüssigkeit nicht durchlässig war.

Die Zentrifugation von Zellen und Scaffold ergab gutes Zellwachstum auf allen drei Membranen. Es wuchsen jedoch viele Zellen neben den Scaffolds in den Kulturschalen. Daraus ließ sich schließen, dass nicht die komplette, eingesetzte Zellzahl auf den Scaffolds wuchs. Auch die Bilder von Kryoschnitten bestätigten dies, da teilweise Fibroblasten nicht nur auf der Oberseite sondern auch auf der Unterseite der Membran zu erkennen waren.

Die dritte Methode ergab mit einem gleichmäßigen Bewuchs der Scaffold-Oberfläche das beste Ergebnis. Durch die Fixierung mit Polystyrol-Rähmchen wurde garantiert, dass die eingesetzte Zellzahl auch wirklich auf dem Zellträger anwuchs und nicht in der Kulturschale oder auf der Unterseite der Membran (Abbildung 46).

Bei keiner der verwendeten Methoden zeigte sich jedoch ein Zellwachstum innerhalb des Scaffolds, wie es bei diesen Versuchen erwartet wurde. Es wurde im Folgenden die Methode 3 (siehe V 1.3.1) zur Aussaat von Fibroblasten auf Scaffolds verwendet. Es war denkbar, dass die Fibroblasten erst nach der Aussaat von Keratinozyten auf die Dermal-Äquivalente anfangen in die Scaffolds zu migrieren.

4. Entwicklung von Oralmukosa-Äquivalenten (OMÄ) (Keratinocyten auf Dermal-Äquivalenten)

Zur Entwicklung von Oralmukosa-Äquivalenten (OMÄ) wurden Keratinocyten wie in V 1.3.2 beschrieben auf die Dermal-Äquivalente ausgesät, jeweils Fibroblasten und Keratinocyten vom gleichen Spender.

Da sich in VI 1.2.2 zeigte, dass dünn ausgesäte Keratinocyten im Differenzierungsmedium (GM) nur ein langsames Proliferationspotential besitzen, wurde die Zellzahl der ausgesäten Keratinocyten so eingestellt, dass die Keratinocyten in Kontroll-Well mit der Größe des Transplantates (ein Well eines 8-Well Chamber-Slides; Kulturfläche: 0,7 cm²) bereits nach einem Tag konfluent waren. Dies wurde bei einer Zellkonzentration von 5E5/cm² erreicht.

Ein Versuch zur Entwicklung von OMÄs in KGM + 1,8 mM CaCl₂, ein Medium, das in VI 1.2.2 aufgrund des guten Keratinocytenwachstums erfolgversprechend war zeigte, dass die Keratinocyten in diesem Medium nicht fähig sind auf Scaffolds eine zusammenhängende Oberfläche auszubilden oder mehrere Schichten zu formen wie dies in GM gelingt.

4.1 Submerskultur von Oralmukosa-Äquivalenten auf TFE, DRT und Vicryl

In diesem Versuch wurden OMÄs auf TFE, DRT und Vicryl submers in Zellkulturmedium für F 14 + K 7 Tage und F 21 + K 14 Tage kultiviert (7-tägige Vorkultur der Fibroblasten auf Scaffolds in DMEM/F12 mit anschließender 7- oder 14-tägige Kokultur von Keratinocyten auf DÄs in GM). Alle Experimente wurden 3 - 5 x mit Zellen verschiedener Spender wiederholt. Die Auswertung erfolgte anhand von fluoreszenzmikroskopischen Bildern nach IHC-Färbungen von Kryoschnitten.

Es wurde die Migrationsfähigkeit der Fibroblasten (Einwachsen der Fibroblasten in die Membran in µm) sowie die Schichtdicke der Keratinocyten in µm und die Anzahl ihrer Zelllagen (n) gemessen. Die Daten zeigen Durchschnittswerte von vier Messpunkten repräsentativer Bilder pro Ansatz. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 21 und Abbildung 48 - 50 zusammengefasst.

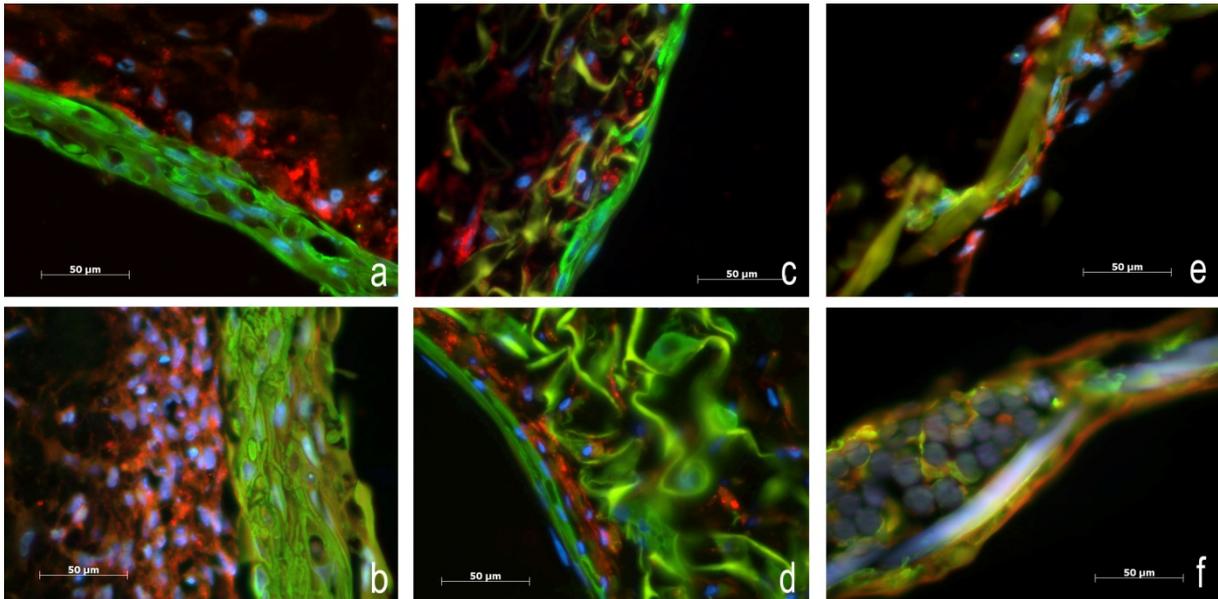


Abbildung 47:

OMAs nach Submerskultur auf TFE (a, b), DRT (c, d) und Vicryl (e, f). 5E5 Keratinozyten/cm² wurden für 7 Tage (a, c, e) und 14 Tage (b, d, f) auf DÄs kultiviert. IIF von CD 90, rot (Fibroblasten) und Keratin 14, grün (Keratinozyten). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Vergrößerung: 400x

TFE:

Nach F 14 + K 7-tägiger Kokultur von Keratinozyten auf Dermal-Äquivalenten zeigte sich, dass die Fibroblasten, die ohne Keratinozyten nur auf der Membranoberfläche gewachsen waren (VI 3.1.1, VI 3.1.2), 243,3 µm in die Membran einwandern konnten (Abbildung 47 a). Nach F 21 + K 14 Tagen verstärkte sich dieser Effekt (Migration: 249,3 µm). Die Fibroblasten konnten sich in der Membran weiter vermehren und lagen nun dicht gedrängt vor (Abbildung 47 b). Die Keratinozyten bildeten nach F 14 + K 7 Tagen Kokultur eine homogene Schicht aus 4,5 Zellschichten mit einer Dicke von 34,9 µm auf der Oberfläche der Membran (Abbildung 47 a). Nach F 21 + K 14 Tagen konnte die Zellschicht im mittleren Bereich der Membran auf eine Dicke von 111,6 µm anwachsen. Sie bestand aus 9,3 Zellschichten (Abbildung 47 b). Die Membran war nach insgesamt 21-tägiger Kultur in Medium bereits starken Abbauvorgängen unterworfen. Sie war sehr weich und flexibel und an den Stellen mit dem stärksten Zellwachstum teilweise stark deformiert. Vor einem klinischen Einsatz ist zu prüfen, ob sie den speziellen Anforderungen in der Mundhöhle, besonders im Bezug auf die mechanische Beanspruchung gerecht wird.

DRT:

Fibroblasten konnten ähnlich wie beim TFE mit der Aussaat der Keratinozyten in die Membran migrieren, nach F 14 + K 7 Tagen Kokultur um 314,8 μm (Abbildung 47 c), nach F 21 + K 14 Tagen um 420,9 μm (Abbildung 47 d). Die Keratinozyten konnten trotz der vielen Oberflächenzwischenräume eine konfluente Zellschicht auf der Membranoberfläche bilden wie bei TFE (16,2 μm , 2,3 Zellschichten nach F 14 + K 7 Tagen, Abbildung 47 c). Die Dickenzunahme der Keratinozyten-Schicht war nach F 21 + K 14 d jedoch nicht so stark wie bei TFE und vergrößerte sich lediglich auf 31,0 μm und 2,7 Zellschichten (Abbildung 47 d). Die Anordnung der Zellen erschien jedoch nach F 21 d + K 14 d gleichmäßiger und dichter als nach F 14 + K 7 d. Im Gegensatz zu TFE blieb die Membran über den gesamten Versuchszeitraum von 21 Tagen stabil und verformte sich nicht.

Vicryl:

Auf Vicryl wuchsen sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten. Der Zellverband hielt die einzelnen Vicryl-Fasern zusammen, so dass die Membran beim Schneidevorgang zu Kryoschnitten nicht zerfiel, wie dies bei der Kultur allein mit Fibroblasten geschah. Dieser stabilisierende Effekt war nach F 21 + K 14-tägiger Kokultur (Abbildung 47 f) deutlicher ausgeprägt als nach F 14 + K 7 Tagen (Abbildung 47 e). Daraus ließ sich schließen, dass sich die Zellen im Versuchsverlauf vermehren können. Eine Schichtung der Zellen in Dermis (Fibroblasten) und Epidermis (Keratinozyten) war nicht zu erkennen, wie dies bei der Kultur auf TFE und DRT vorlag. Die Zellen wuchsen unkoordiniert und gemischt um die Membran herum, die jedoch über den Versuchszeitraum stabil blieb.

Vergleich der in Submerskultur hergestellten Oralmukosa-Äquivalente

Tabelle 21: Überblick der Oralmukosa-Äquivalente auf TFE, DRT und Vicryl nach Submerskultur

Scaffold	Dicke	Biokompatibilität	Biostabilität	Zellwachstum nach 21 d (F 21 d + K 14 d)
TFE	0,30 - 0,60 mm	gutes Zellwachstum	Membran wird nach 21-tägiger Kultur sehr weich und deformiert sich an den Stellen mit dem stärksten Zellwachstum	Fibroblastenmigration: 249,3 µm Keratinocyten: Schichtdicke: 111.6 µm Zellschichten: 9,3
DRT	0,80 - 0,95 mm	gutes Zellwachstum	Membran bleibt über den gesamten Versuchszeitraum stabil	Fibroblastenmigration: 420,9 µm Keratinocyten: Schichtdicke: 31,0 µm Zellschichten: 2,7
Vicryl	0,05 - 0,10 mm	gutes Zellwachstum	Membran bleibt über den gesamten Versuchszeitraum stabil	Fibroblasten und Keratinocyten wuchsen gemischt um die Membran herum. Es war keine Bildung von Dermis und Epidermis erkennbar.

Das beste Zellwachstum zeigte sich auf TFE. Die Anzahl der Zellschichten der Keratinocyten war hier am größten und nahm deutlich gegen Ende des Versuchszeitraumes zu. Auch die Migration der Fibroblasten war gut und konnte nach einer Kulturzeit von F 21 + K 14 Tagen im Vergleich zum Wachstum von F 14 + K 7 Tagen leicht gesteigert werden (Abbildung 48: - 50). Die statistische Auswertung über den unabhängigen, zweiseitigen t-Test ergab zumeist keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Werte. Lediglich der Vergleich der Anzahl an gebildeten Keratinocyten-Schichten auf TFE nach F 14 + K 7 Tagen Kulturzeit resultierte in einem signifikanten Unterschied zur Anzahl der Schichten bei einer Kulturzeit von F 21 + K 14 Tagen. Auch die Anzahl an Keratinocyten-Schichten nach F 21 + K 14 Tagen auf dem TFE-Scaffold im Vergleich zur DRT-Membran erbrachte ein signifikantes Ergebnis. Auf TFE bildeten sich signifikant mehr Keratinocyten-Schichten als auf DRT ($p \leq 0,05$).

Allerdings eignet sich die TFE-Membran nicht für einen klinischen Einsatz, da sie gegen Ende des Versuchszeitraumes stark degeneriert. Ebenso ist das Zellwachstum nicht gleichmäßig über die Membran verteilt. In Bereichen mit hohem Zellwachstum unterliegt der TFE-Scaffold starken Verformungen.

Die Kombination von gutem Zellwachstum mit einer natürlichen Schichtung in Dermis und Epidermis und ausreichender Stabilität konnte nur bei DRT gezeigt werden. Diese Membran unterliegt keiner Veränderung über den Versuchszeitraum von insgesamt 21 Tagen hinweg und es ergab sich eine gute Trennung von Dermis und Epidermis. Die Oberfläche wurde von einer homogenen Schicht Keratinozyten bedeckt, während die Fibroblasten durch die lockere Struktur sehr gut einwandern konnten. Nachteilig war, dass die Keratinozytenschicht auch nach F 21 + K 14-tägiger Kultur noch dünn war (Abbildung 49). Die Dicke könnte durch Optimierung der Kulturbedingungen (VI 4.2) für künftige Versuche gesteigert werden.

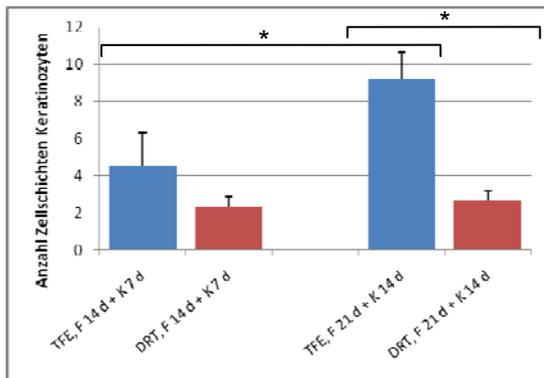


Abbildung 48:
Vergleich der Anzahl an Keratinozytenschichten auf TFE und DRT nach F 14 + K 7 Tagen und F 21 + K 14 Tagen Kulturzeit

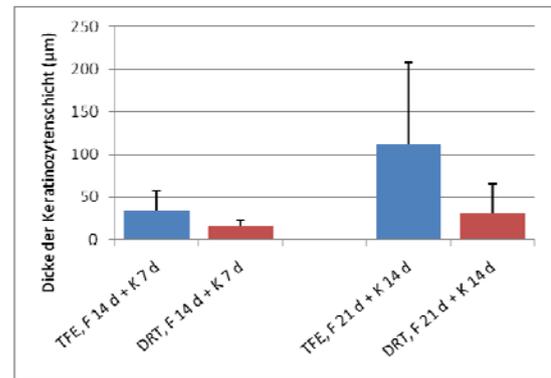


Abbildung 49:
Dicke der Keratinozytenschichten auf TFE und DRT nach F 14 + K 7 Tagen und F 21 + K 14 Tagen Kulturzeit in µm

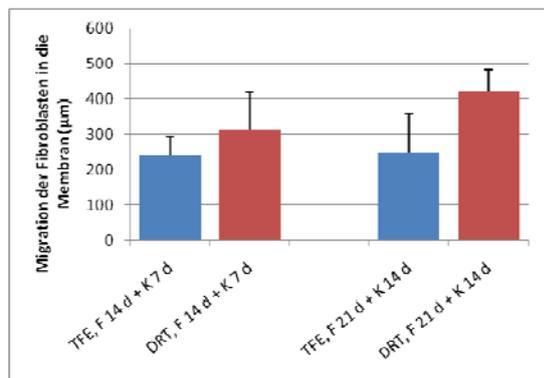


Abbildung 50:
Vergleich Migration von Fibroblasten in TFE und DRT nach F 14 + K 7 Tagen und F 14 + K 21 Tagen Kulturzeit in µm

4.1.1 Untersuchung zur Bildung von Proteinen der Basallamina

4.1.1.1 Kollagen IV

Immunhistochemie

In Haut und Mundschleimhaut bildet die Basalmembran, ein zweidimensionales Aggregat verschiedener Proteine, die Grenzschicht zwischen Dermis und Epidermis (siehe III 1.2.2). Da es sich um ein gewebeahes Konstrukt handelt, ist auch *in vitro* die Bildung einer Basalmembran zu erwarten.

Um dies zu überprüfen wurden immunhistochemische Färbungen von Kollagen IV an Kryoschnitten der OMÄs durchgeführt, da dieses Protein einen Hauptbestandteil der Basalmembran darstellt.

In Vicryl zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen von Kollagen IV aufgrund der unzureichenden OMÄ-Architektur erwartungsgemäß keine Expression dieses Moleküls. Kollagen IV war in DRT nach F 21 + K 14-tägiger Kulturzeit nachzuweisen, jedoch war keine lineare Ablagerung in der Basalmembranzzone zu verzeichnen. Das Molekül war in Epidermis und Dermis gleichermaßen zu finden.

Das beste Ergebnis erbrachte die Färbung von OMÄs auf TFE. Hier war bereits in Präparaten nach F 14 + K 7-tägigem Zellwachstum eine Färbung zwischen der Epithelschicht auf der Membran und der Dermis-Schicht mit Fibroblasten im Scaffold zu erkennen (Abbildung 51 a). Dies und die deutliche Begrenzung des Kollagens auf den Bereich zwischen den verschiedenen Zellarten konnte nach F 21 + K 14-tägiger Kulturzeit noch gesteigert werden (Abbildung 51 b) und war mit dem Vorkommen in normaler Mundschleimhaut vergleichbar (Abbildung 51 c).

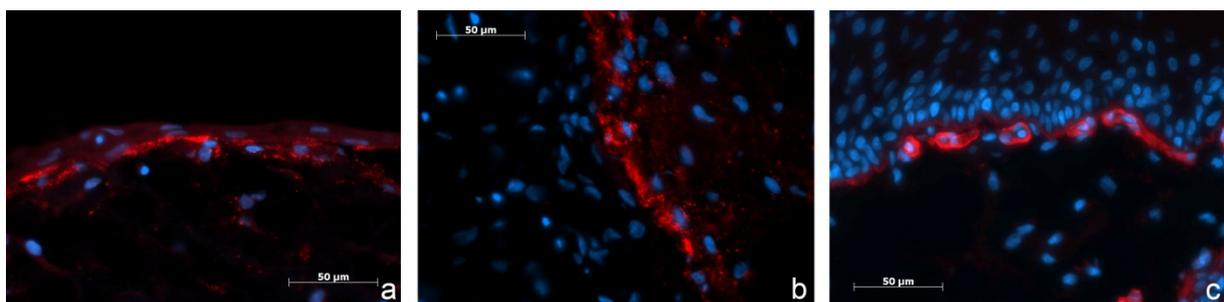


Abbildung 51:

OMÄs nach Submerskultur auf TFE für 14 + 7 Tage (a) und 21 + 14 Tage (b) im Vergleich mit einer Mundschleimhautprobe (c) (Kontrolle). IIF von Kollagen-IV (rot) in der Basalmembranzzone. Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Vergrößerung: 400x

RNA-Mengen

Um die histologischen Ergebnisse zu verifizieren wurde die Bildung von Proteinen der Basallamina auf RNA-Ebene untersucht. Die Isolation von RNA aus Zellen ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt, da nur die Gene, die auch aktuell in der Zelle transkribiert werden in diesem Moment als RNA vorliegen.

Um PCRs durchführen zu können wurde zunächst die Gesamt-RNA der Mundschleimhautkonstrukte auf TFE und DRT isoliert, um daraus cDNA herzustellen, die als Template für die PCR eingesetzt wurde. Zum Vergleich wurden nur Fibroblasten für 21 Tage oder nur Keratinozyten für 14 Tage auf die Scaffolds ausgesät um festzustellen, ob diese Einzelkulturen Unterschiede zur Kokultur mit beiden Zellarten ergeben ($n = 5$). Dabei entspricht die Summe der 21-tägigen Fibroblasten-Kulturen und der 14-tägigen Keratinozyten-Kulturen der gleichen Zellzahl und den gleichen Wachstumszeiten wie die F 21 + K 14-tägige Kokultur aus Fibroblasten und Keratinozyten.

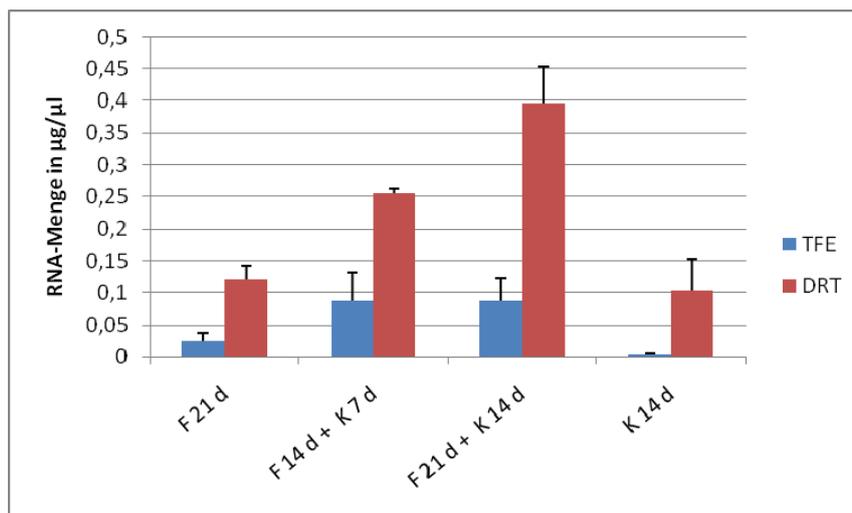


Abbildung 52:
RNA-Mengen, die aus submers auf TFE und DRT kultivierten Mundschleimhautkonstrukten isoliert werden konnten ($n = 5$)

Die Untersuchung zeigte, dass die RNA-Menge, die aus DRT-Konstrukten isoliert werden konnte, deutlich größer war, als die der TFE-Konstrukte. Bei beiden Unterlagen war zu erkennen, dass die Kokulturen schon nach F 14 + K 7 Tagen mehr RNA enthielten, als die Einzelkulturen. Dies konnte nach F 21 + K 14-tägiger Kultur noch gesteigert werden. Auch die Summe der RNA-Menge aus 21-tägigen Fibroblasten-Konstrukten und 14-tägigen Keratinozyten-Konstrukten fiel deutlich geringer aus als die RNA-Menge der F 14 + K 21-tägigen Kokultur von Fibroblasten und Keratinozyten, obwohl diese Werte die gleiche Zellzahl und die gleiche Kulturzeit der einzelnen Zellen aufwiesen und somit direkt

miteinander vergleichbar waren (Abbildung 52). Die erhaltenen Messwerte variierten schwach, wie es anhand der geringen Standardabweichungen zu erkennen ist. Daraus kann auf eine höhere Zellaktivität oder eine größere Zellmasse bei Kokulturen insbesondere bei der Aussaat auf DRT geschlossen werden.

Qualität der RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde durch die Anfertigung von RNA-Gelen (denaturierende MOPS-Formaldehydgel) überprüft (V 4.2).

Auf dem Gel waren 2 Banden sichtbar, die die 28S und 18S rRNA darstellen, wie es bei intakter RNA der Fall ist (Abbildung 53).

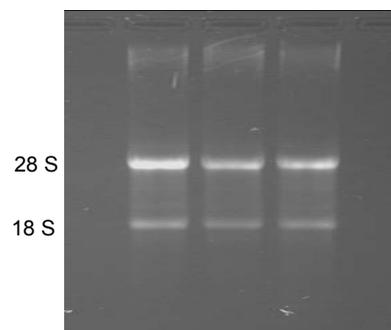


Abbildung 53:
RNA-Gel von 3 verschiedenen Proben, auf dem 2 Banden sichtbar sind, die die 28S und 18S rRNA darstellen

PCR

Die Expression von Kollagen IV (Kol IV) in OMÄs auf TFE und DRT wurde unter Einsatz der isolierten RNA auf molekularer (RNA-) Ebene mittels konventioneller PCR semi-quantitativ und mittels Real Time RT-PCR (LightCycler ®1.5 Real-Time PCR System) quantitativ ermittelt.

Semi-quantitative PCR:

Mit der konventionellen PCR wurde eine semi-quantitative Analyse der Expression von Kol IV in Mundschleimhautkonstrukten auf TFE und DRT durchgeführt. Es wurden jeweils Proben der F 14 + K 7-tägigen und F 21 + K 14-tägigen Kokultur mit 21-tägigen Fibroblastenkulturen sowie 14-tägigen Keratinozytenkulturen auf Membranen verglichen (n = 3 - 4). Dazu wurde die amplifizierte DNA auf einem 1,75 % Agarosegel aufgetrennt, fotografiert (Abbildung 54) und die Banden densitometrisch mit Hilfe des Programmes ImageJ ausgewertet.

Die Expressionsstärke wurde relativ zum Referenzgen β -Actin bestimmt. Dabei wurde die Expression von F 21 + K 14-tägigen Kokultur gleich 100 % und die übrigen Werte zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt. Die Menge an isolierter RNA der 14-tägigen Keratinozytenkulturen auf TFE war nicht ausreichend, um daraus ein cDNA-Template für PCRs herzustellen. Daher ist dieser Wert im Folgenden nicht aufgeführt.

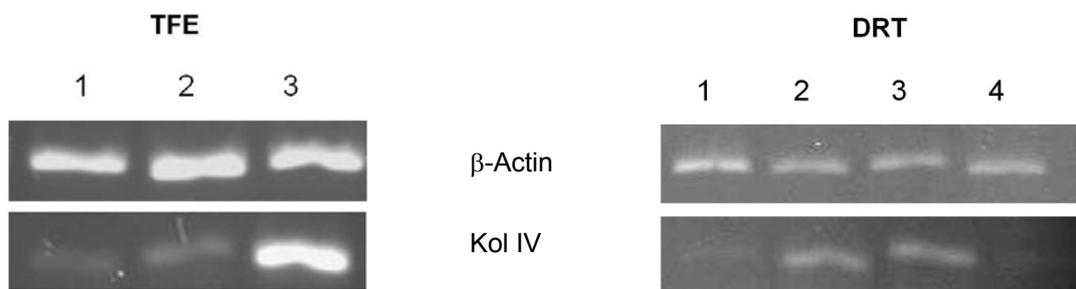


Abbildung 54:

Expressionsanalyse von Kol IV in TFE und DRT-Konstrukten durch semiquantitative PCR im Vergleich zum Referenzgen β -Actin. Spur 1 zeigt jeweils die Expression nach 21-tägiger Kultivierung von Fibroblasten, Spur 2 zeigt die Kokultur von Fibroblasten und Keratinozyten nach F 14 + K 7 Tagen Kulturzeit, Spur 3 zeigt die Kokultur von Fibroblasten und Keratinozyten nach F 21 + K 14 Tagen Kulturzeit und Spur 4 zeigt die Expression nach 14-tägiger Kultivierung von Keratinozyten (n = 3 - 4)

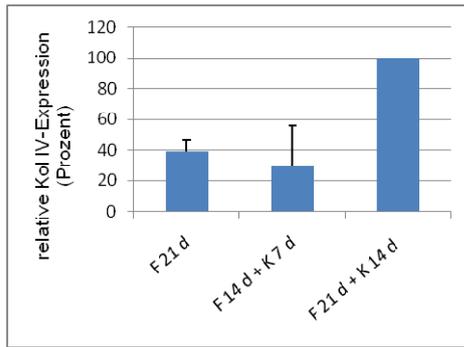


Abbildung 55:
Semiquantitative Bestimmung der Kol IV-Expression der Zellen auf TFE nach densitometrischer Auswertung der PCR-Banden mit ImageJ

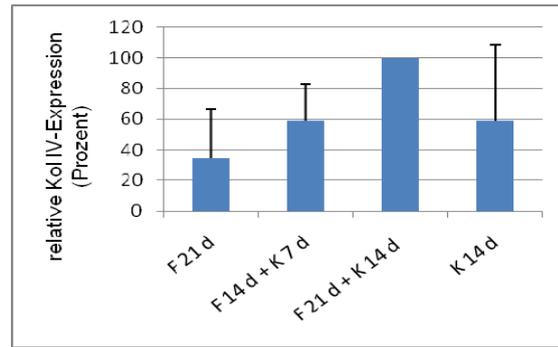


Abbildung 56:
Semiquantitative Bestimmung der Kol IV-Expression der Zellen auf DRT nach densitometrischer Auswertung der PCR-Banden mit ImageJ

Die densitometrische Auswertung der PCR-Banden im Agarosegel ergab auf TFE wie erwartet die höchste Expression von Kol IV bei F 21 + K 14-tägigen Kokulturen. Der Wert bei F 14 + K 7-tägigen Kokulturen war deutlich geringer. Im Mittel lag er sogar niedriger als der Expressionswert der 21-tägigen Fibroblastenkulturen (Abbildung 55). Auch auf DRT zeigte die F 21 + 14-tägige Kokultur den höchsten Expressionswert von Kol IV. Auf dieser Unterlage ist nach F 14 + K 7-tägiger Kokultur eine höhere Kol IV-Expression zu erkennen als bei den Kulturen der einzelnen Zellarten für 21 (Fibroblasten) bzw. 14 Tage (Keratinozyten) (Abbildung 56).

Die hohen Schwankungen der Ergebnisse waren aufgrund der eingesetzten primären Zellen und damit durch individuelle Unterschiede der Zellen einzelner Spender zu erwarten. Um Genexpressionen der Zellen auf den einzelnen Zellträgern direkt miteinander vergleichen zu können, wurde von diesem Ansatz im Anschluss eine quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) durchgeführt.

Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)

Die relative Quantifizierung mittels RT-qPCR (LightCycler® 1.5) wurde mit Effizienzkorrektur durchgeführt. Auch hier wurde β -Actin als Referenzgen eingesetzt und damit die relative Ratio der einzelnen Proben berechnet (siehe V 4.5.2).

Mit dieser Methode sind die Expressionswerte direkt vergleichbar, da sie durch einen Kalibrator normalisiert wurden. Es wurden jeweils 5 Proben durch Doppelbestimmung gemessen, die Werte gemittelt, die jeweilige Standardabweichung berechnet und graphisch dargestellt (Abbildung 57).

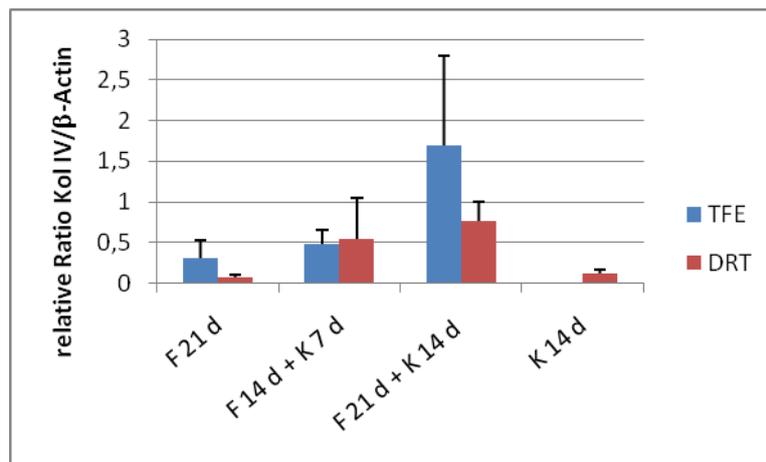


Abbildung 57:
Relative Quantifizierung der Kol IV-Expression der Zellen auf TFE (blau) und DRT (rot) im direkten Vergleich (n = 5)

Die Methode der quantitativen Messung der Expression von Kol IV brachte ähnliche Ergebnisse wie die semiquantitative PCR. Der höchste Expressionswert lag bei der F 21 + K 14-tägigen Kokultur sowohl auf TFE als auch auf DRT vor. Auch die F14 + K 7-tägige Kokultur zeigte auf beiden Scaffolds im Vergleich zu den Einzelzellkulturen eine gesteigerte Kol IV Expression. Die Werte waren bei Kulturen auf TFE bis auf die F 14 + K 7-tägige Kokultur höher als auf DRT. Dies kann mit der besseren Zellarchitektur und der natürlicheren Schichtung der Zellen auf TFE erklärt werden und bestätigt die immunhistochemischen Ergebnisse. Die Qualität der OMÄs unterliegt jedoch starken Schwankungen, wie es besonders bei hohen Expressionswerten anhand der Standardabweichung zu erkennen ist. Die statistische Analyse mit Hilfe des abhängigen zweiseitigen t-Tests ergab für Vergleiche der jeweils kürzer kultivierten Kokulturen mit den länger kultivierten Kokulturen keine signifikanten Unterschiede. Auch der Vergleich von F 21 d + K 14-tägigen Kulturen auf den verschiedenen Membranen ergab in einem unabhängigen zweiseitigen t-Test keine signifikanten Unterschiede. Die Summe der Kollagen IV Expression aus 21-tägigen Fibroblasten-Konstrukten und 14-tägigen Keratinozyten-Konstrukten im Vergleich zu F 21 d + K 14-tägigen Kokulturen auf DRT wurde ebenfalls durch den abhängigen, zweiseitigen t-Test untersucht.

Die Werte unterschieden sich signifikant ($p \leq 0,05$) und wurden graphisch mit einem Boxplot dargestellt (Abbildung 58). Mit Proben auf TFE war dieser Vergleich nicht möglich, da aufgrund fehlender cDNA keine PCR der 14-tägigen Keratinozyten-Konstrukten durchgeführt werden konnte.

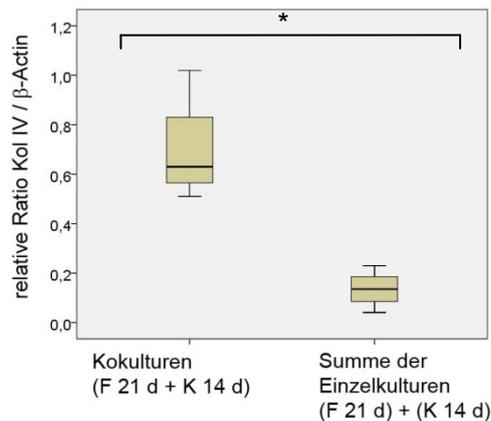


Abbildung 58:
Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Kol IV-Expression von F 21 d + K 14-tägigen Kokulturen im Vergleich zur Summe von 21-tägigen Fibroblasten-Kulturen und 14-tägigen Keratinozyten-Kulturen auf DRT. Die Werte unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

4.1.1.2 Laminin

Laminin ist neben Kollagen IV ein weiterer Hauptbestandteil der Basalmembran. Besonders Laminin 1 (Seitenketten: $\alpha 1\beta 1\gamma 1$) und Laminin 5 (Seitenketten: $\alpha 3\beta 3\gamma 2$) sind von hoher Wichtigkeit beim Hautaufbau. Wie in III 1.2.2 beschrieben, bildet Laminin 1 wie Kollagen IV ein Netzwerk, das als Gerüst für weitere Proteine der Basalmembran dient. Laminin 5 dagegen ist das Schlüsselprotein der Ankerfilamente der Basalmembran und verbindet die Basalmembran mit den Hemidesmosomen der Epithelzellen.

Die Expression beider Gene wurde mittels RT-qPCR quantitativ bestimmt. Der verwendete Primer zur Detektion der Expression von Laminin 1 war eine Gensequenz zur Codierung der $\gamma 1$ -Seitenkette des Proteins. Für Laminin 5 wurde eine Sequenz zur Codierung der $\gamma 2$ -Seitenkette des Proteins verwendet.

Während es neben Laminin 1 weitere Laminin-Moleküle gibt, die die $\gamma 1$ Kette enthalten und somit mit detektiert werden, ist Laminin 5 das einzige Laminin mit der Seitenkette $\gamma 2$. Der Nachweis von Laminin 5 ist somit spezifischer als der für Laminin 1. Laminin 1 ist jedoch das häufigste Molekül mit der Seitenkette $\gamma 1$ in der verwendeten Gewebeart. Auch die Seitenketten $\beta 1$ und $\gamma 1$ kommen noch bei anderen Lamininen vor und kamen somit nicht als spezifischere Primer in Frage.

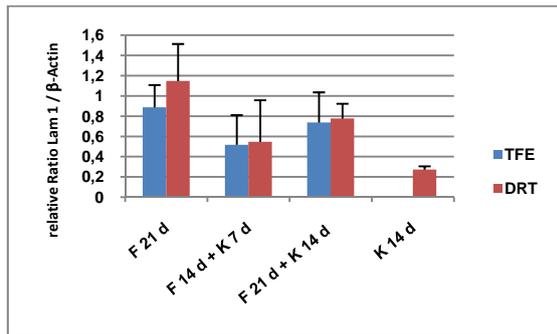


Abbildung 59:
Relative Quantifizierung Laminin 1-Expression der Zellen auf TFE (blau) und DRT (rot) im direkten Vergleich (n = 5)

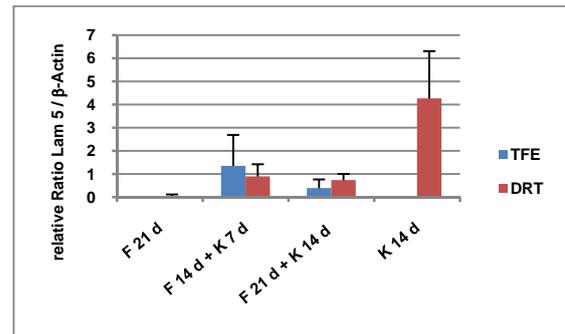


Abbildung 60:
Relative Quantifizierung Laminin 5-Expression der Zellen auf TFE (blau) und DRT (rot) im direkten Vergleich (n = 5)

Die Expression von Laminin 1 nahm wie die Expression von Kollagen IV bei den Kokulturen aus Fibroblasten und Keratinozyten mit der Zeit zu. Nach F 21 + K 14 Tagen Kokultur war sie größer als nach F 14 + K 7-tägiger Kultur, was für eine Reifung der OMÄs spricht. Der höchste Wert zeigte sich nach 21-tägiger Einzelkultur von Fibroblasten. Die Einzelkultur von Keratinozyten auf Scaffolds exprimierte am wenigsten Laminin 1. Auf DRT wurde Laminin 1 generell stärker exprimiert als auf TFE (Abbildung 59).

Bei der Expression von Laminin 5 zeigte sich bei den Kokulturen ein gegenteiliges Expressionsmuster zur Laminin 1 Expression. Der größere Wert wurde nach F 14 + K 7-tägiger Kultur gemessen, ein kleinerer nach F 21 + K 14-tägiger Kultur. Es ist vorstellbar, dass die meisten Zellen der dünnen Epithelschicht nach F 14 + K 7-tägiger Kultur mit der Grenze zwischen Epithel und Dermis in Kontakt kamen und deshalb viele Ankerfilamente ausgebildet wurden. Mit dem Anstieg der Epitheldicke nach F21 + K 14-tägiger Kultur konnte nur die unterste Zellschicht der Epidermis Ankerfilamente ausbilden und somit Laminin 5 exprimieren, weiter apikal gelegene Epithelschichten dagegen nicht. Somit nahm die Gesamtexpression von Laminin 5 mit der steigenden Kulturzeit ab. Fibroblasten alleine exprimierten sowohl auf DRT als auch auf TFE kein Laminin 5, Keratinozyten alleine auf DRT dagegen in besonders hohem Maß (Abbildung 60).

Folgende Vergleiche wurden durch abhängige bzw. unabhängige, zweiseitige t-Tests statistisch analysiert:

- Vergleich der F 14 + K 7-tägigen Kokulturen mit den F21 + K 14-tägigen Kokulturen auf TFE (abhängiger Test)
- Vergleich der F 14 + K 7-tägigen Kokulturen mit den F21 + K 14-tägigen Kokulturen auf DRT (abhängiger Test)
- Vergleich F21 + K 14-tägigen Kokulturen auf TFE mit den F21 + K 14-tägigen Kokulturen auf DRT (unabhängiger Test)
- Vergleich von F 21 d + K 14-tägigen Kokulturen mit der Summe von 21-tägigen Fibroblasten-Kulturen und 14-tägigen Keratinozyten-Kulturen auf DRT (abhängiger Test)

Die relativ quantifizierte Laminin 1-Expression ergab bei allen genannten Vergleichen keine signifikanten Unterschiede. Die Summe der Laminin 5-Expression aus 21-tägigen Fibroblasten-Konstrukten und 14-tägigen Keratinozyten-Konstrukten im Vergleich zu F 21 + K 14-tägigen Kokulturen auf DRT unterschied sich signifikant ($p \leq 0,05$) und wurde graphisch in einem Boxplot dargestellt (Abbildung 61). Die übrigen Vergleiche zeigten auch bei der Laminin 5-Expression keine signifikanten Unterschiede.

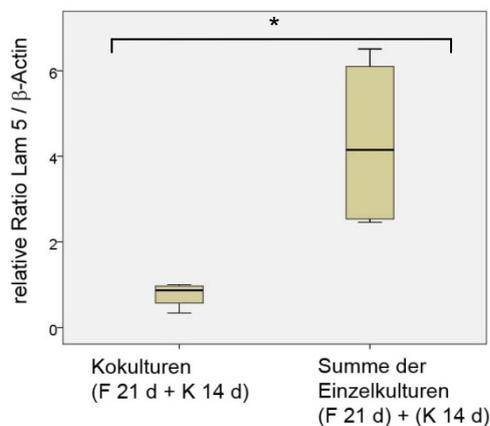


Abbildung 61:
Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Laminin 5-Expression von F 21 d + K 14-tägigen Kokulturen im Vergleich zur Summe von 21-tägigen Fibroblasten-Kulturen und 14-tägigen Keratinozyten-Kulturen auf DRT. Die Werte unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

4.1.2 Differenzierungspotential (K13, K14)

Neben der Fähigkeit zur Bildung der Basalmembran wurde das Differenzierungspotential der OMÄs mittels RT-qPCR untersucht. Als Marker dienten Keratin 14 (K14) für basale Keratinozyten und Keratin 13 (K13) als früher Differenzierungsmarker nicht verhornter oraler Epithelien, deren Expression quantitativ bestimmt wurde.

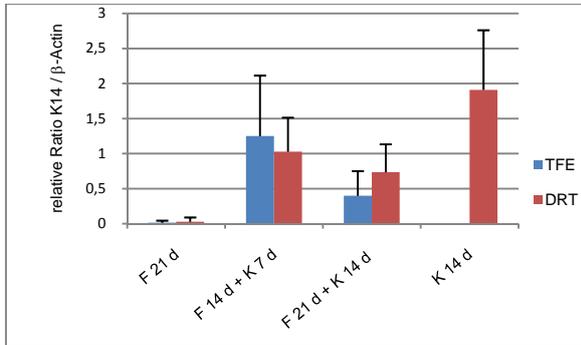


Abbildung 62:
Relative Quantifizierung der Keratin 14-Expression von Zellen auf TFE (blau) und DRT (rot) im direkten Vergleich (n = 5)

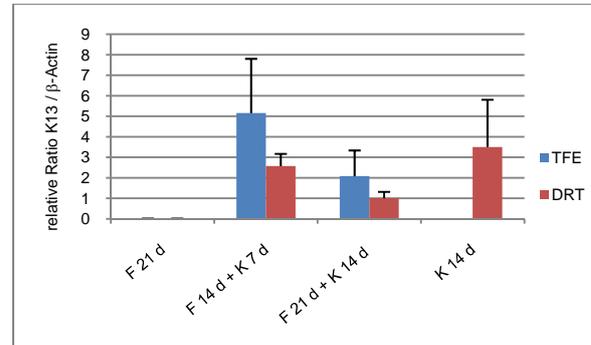


Abbildung 63:
Relative Quantifizierung der Keratin 13-Expression von Zellen auf TFE (blau) und DRT (rot) im direkten Vergleich (n = 5)

Beide Marker hatten in 14-tägigen Keratinozyten-Einzelkulturen eine hohe Expression, Keratin 14 sogar die höchste. Bei den Kokulturen zeigte sich nach F 14 + K 7 Tagen der größere Wert, der nach F 21 + K 14-tägiger Kultur abfiel. Dieses Ergebnis beweist ein Expressionsmaximum beider Marker nach kürzerer Kulturzeit (F 14 + K 7), auch die des Differenzierungsmarkers K 13 (Abbildung 62, 63). Diese Ergebnisse wurden durch die statistische Analyse bestätigt.

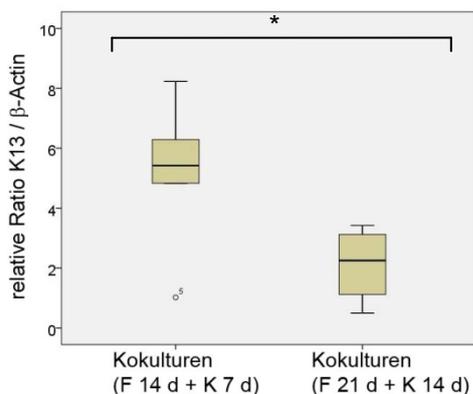


Abbildung 64:
Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Keratin 13-Expression der F 14 + K 7-tägigen Kokulturen im Vergleich zu den F 21 + K 14-tägigen Kokulturen auf TFE. Die Werte unterscheiden sich signifikant (n = 5; $p \leq 0,05$)

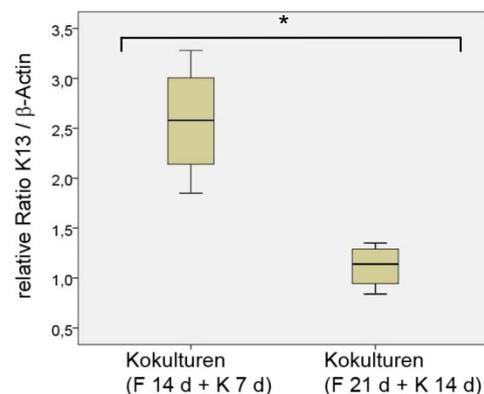


Abbildung 65:
Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Keratin 13-Expression der F 14 + K 7-tägigen Kokulturen im Vergleich zu den F 21 + K 14-tägigen Kokulturen auf DRT. Die Werte unterscheiden sich signifikant (n = 5; $p \leq 0,05$)

Der abhängige, zweiseitige t-Test ergab signifikante Unterschiede der F 14 + K 7-tägigen Kokulturen zu den F 21 + K 14-tägigen Kokulturen, sowohl auf TFE als auch auf DRT (Abbildung 64, 65). Die Fibroblasten-Einzelkulturen exprimierten keine Keratine (Abbildung 62, 63).

Die in VI 4.1.1.2 aufgelisteten Vergleiche wurden auch für die Keratin 14- und Keratin 13-Expression angestellt und durch abhängige bzw. unabhängige, zweiseitige t-Tests statistisch analysiert. Bis auf die bereits erwähnten signifikanten Unterschiede ergaben die Tests keine weiteren Signifikanzen.

4.2 Kultur von Oralmukosa-Äquivalenten am „Air Liquid Interface“

4.2.1 Kultur von OMÄs am „Air Liquid Interface“ auf DRT

OMÄs auf TFE stellten sich aufgrund der Instabilität des Scaffolds während der *in vitro* Versuche als ungeeignet für eine Transplantation heraus. Deshalb wurde im nächsten Schritt das OMÄ auf DRT bezüglich der Dicke der Epithelschicht optimiert. Laut Literaturangaben wirkt sich eine Luft-exponierte Keratinozyten-Kultur positiv auf ein mehrschichtiges Wachstum des Epithels sowie dessen Differenzierung aus (el Ghalbzouri et al., 2002, Rosdy and Clauss, 1990, Rosdy et al., 1993).

Deshalb wurden in diesem Versuchsteil OMÄs auf DRT, wie in V 1.3.3 beschrieben, hergestellt. Dazu wurden die Fibroblasten zunächst für 7 Tage submers vorkultiviert, bevor die Keratinozyten ausgesät und anschließend für 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze („Air Liquid Interface“, ALI) kokultiviert (F 21 + K 14 Tage) wurden (n = 6 - 8).

Die Auswertung erfolgte anhand von fluoreszenzmikroskopischen Bildern nach IHC-Färbungen von Kryoschnitten.

4.2.1.1 Untersuchung zur Bildung von Proteinen der Basallamina und des Differenzierungspotentials

Immunhistochemische Untersuchungen

Wie die submers kultivierten OMÄs wurden auch die im ALI-Verfahren kultivierten OMÄs zunächst mit dem Fibroblasten-Marker CD90 und dem Marker für basale Keratinozyten K14 immunhistochemisch angefärbt, um den Aufbau des Transplantates zu überprüfen und mit Originalschleimhaut zu vergleichen.

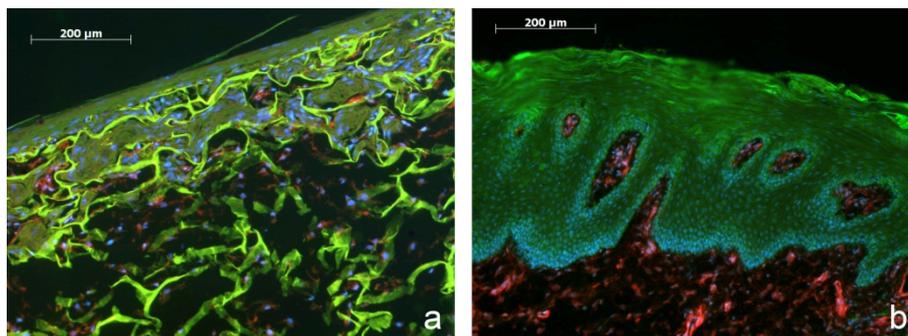


Abbildung 66:

OMÄ nach Kultur im ALI auf DRT in 100-facher Vergrößerung nach einer Kulturzeit von F 21 + K 14 Tagen (a) im Vergleich zu normaler Mundschleimhaut (b). IIF von CD 90, rot (Fibroblasten) und Keratin 14, grün (Keratinozyten). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)

Die Bilder zeigten eine deutlich dickere Keratinozyten-Schicht (Abbildung 66 a), als bei submers kultivierten OMÄs (Abbildung 47 d), die mit der von Originalmundschleimhaut vergleichbar ist (Abbildung 66 b).

Es war zu beobachten, dass die Keratinozyten nur eine dünne Schicht auf der Oberfläche der Membran ausbildeten. Der größere Anteil wuchs in sie hinein, was auf die Grobporigkeit der Membran zurückzuführen ist. Dadurch waren die einzelnen Keratinozytenlagen schwerer zu erkennen und voneinander zu unterscheiden als bei der Submerskultur auf TFE.

Zur weiteren Auswertung wurde die Schichtdicke der Keratinozyten in μm gemessen. Die Daten stellen Durchschnittswerte von vier Messpunkten repräsentativer Bilder pro Ansatz dar ($n = 3 - 4$) (Abbildung 67).

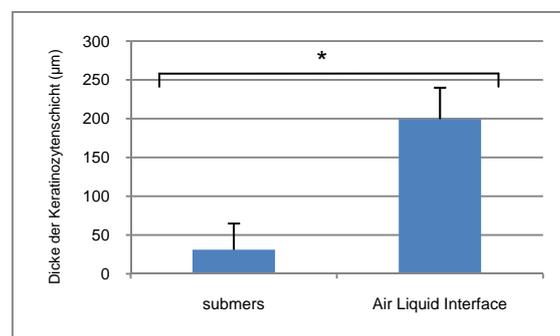


Abbildung 67:
Dicke der Epithelschicht (μm) auf DRT nach 21 + 14 Tagen Kulturzeit in Submerskultur im Vergleich zur Kultur im Air Liquid Interface ($n = 3 - 4$)

Beim Vergleich von OMÄs, die submers kultiviert wurden mit OMÄs, die am „Air Liquid Interface“ kultiviert wurden, zeigte sich ein deutlicher Zuwachs in der Dicke der Keratinozytenschicht. Sie wuchs im Schnitt von 31 μm auf 200 μm an. Die Signifikanz wurde mit dem unabhängigen, zweiseitigen t-Test ermittelt und ergab einen signifikanten Unterschied in der Dicke der Keratinozytenschicht, die sich durch die verschiedenen Kulturbedingungen bildete ($p \leq 0,05$).

Auch diese OMÄs wurden auf die Bildung einer Basalmembran mit Hilfe von immunhistochemische Färbungen des Kollagen IV untersucht. Des Weiteren wurde durch die Färbung von Ki67 die Proliferationsfähigkeit der Zellen überprüft. Die teilungsaktiven Zellen sollen vorwiegend in der Basalschicht des Epithels vorkommen (siehe III 1.2.1).

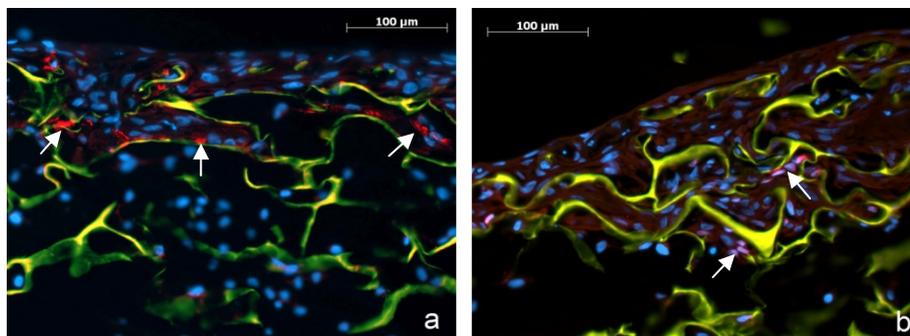


Abbildung 68:
OMÄ nach Kultur im ALI auf DRT in 200-facher Vergrößerung nach einer Kulturzeit von F 21 + K 14; (a) IIF von Kol IV, rot; (b) IIF von Ki67, rot; Färbung der Zellkerne mit DAPI, blau

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine Färbung von Kollagen IV wie vermutet im Grenzbereich zwischen Dermis (Fibroblasten) und Epidermis (Keratinozyten), siehe Pfeile (Abbildung 68 a). Jedoch waren auch Kollageneinlagerungen im weiter apikal gelegenen Teil der Epidermis sichtbar, insbesondere bei Zellen, die Teile der Membran umwuchsen. Die Ki67-Färbung lieferte ein ähnliches Ergebnis. Die meisten positiven Zellkerne waren in der Basalmembranregion zu erkennen, einige dagegen in apikalere Epidermisbereichen (Abbildung 68 b).

RT-qPCR Untersuchungen

RNA-Mengen

Die schon in VI 4.1.1 verwendeten Marker zur Expression von Genen zur Bildung von Proteinen der Basalmembran (Kol IV, Lam 1, Lam 5) und von Genen zur Bildung von Proteinen undifferenzierter und differenzierter Zellen, siehe VI 4.1.2 (Keratin 14, Keratin 13) wurden auch an OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14 Tagen Kulturzeit am ALI eingesetzt und die Expression der genannten Gene auf RNA-Ebene überprüft.

Zur Durchführung der RT-qPCR wurde zunächst die Gesamt-RNA der OMÄs isoliert.

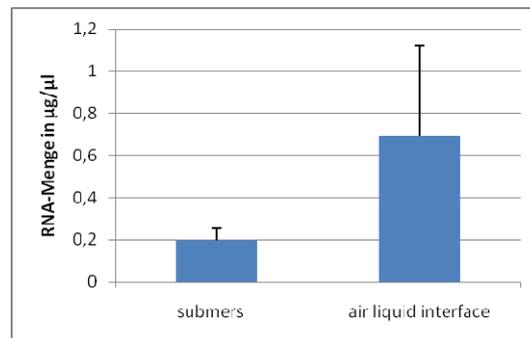


Abbildung 69:
RNA-Mengen, die aus Submers- und Air-Liquid-Interface-Kulturen nach F 21 + K 14-tägiger Kultur isoliert werden konnten in µg/µl (n = 6 - 8)

Wie schon die Dicke der Epithelschicht war auch die RNA-Menge dieser OMÄs deutlich größer, als die RNA-Menge der OMÄs aus Submerskulturen (Abbildung 69). Dies war nach Auswertung der Kryoschnitte zu erwarten, da deutlich mehr Zellen in einer dickeren Epithelschicht vorhanden waren. Obwohl hier der Mittelwert der Kulturen aus dem „Air Liquid Interface“ den Wert der Submerskultur deutlich überstieg, ließ sich über den abhängigen, zweiseitigen t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen.

Relative Quantifizierung

Die anschließende relative Quantifizierung erfolgte wieder mit Effizienzkorrektur. Auch hier wurde β -Actin als Referenzgen eingesetzt und damit die relative Ratio der einzelnen Proben berechnet.

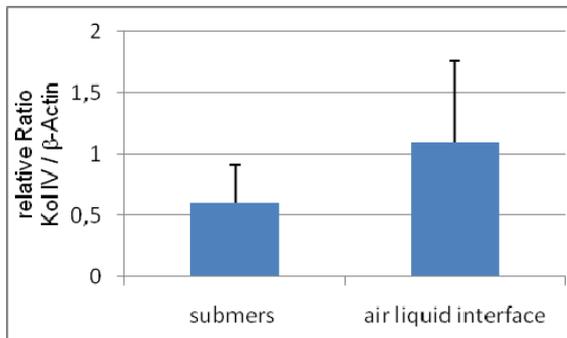


Abbildung 70:
Relative Quantifizierung der Kollagen IV-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur

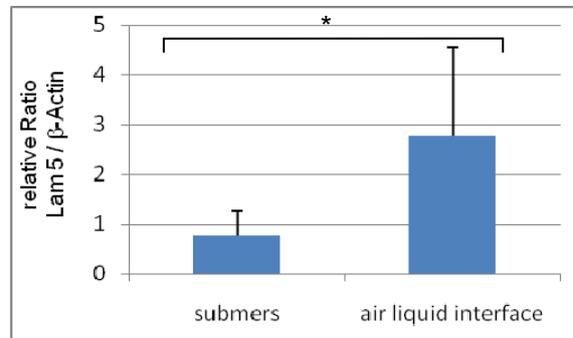


Abbildung 71:
Relative Quantifizierung der Laminin 5-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur

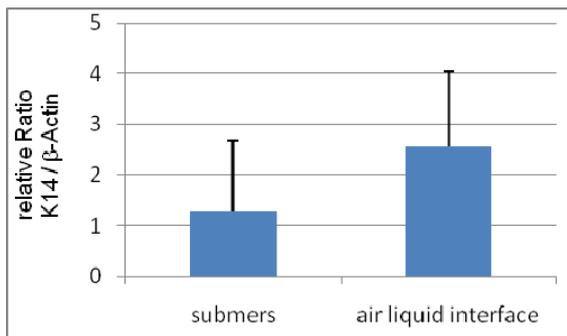


Abbildung 72:
Relative Quantifizierung der Keratin 14-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur

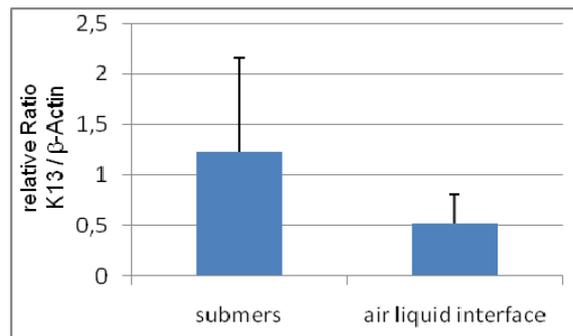


Abbildung 73:
Relative Quantifizierung der Keratin 13-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur

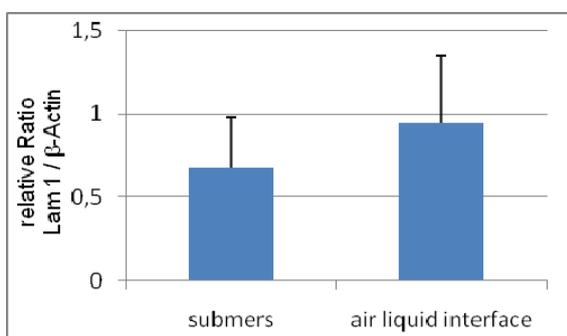


Abbildung 74:
Relative Quantifizierung der Laminin 1-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur

Alle Expressionswerte konnten durch die Kultur am ALI deutlich gesteigert werden mit Ausnahme des frühen Differenzierungsmarkers K13, was für eine geringe Differenzierungsfähigkeit der hergestellten OMÄs sprach (Abbildung 70 - 74). Der abhängige, zweiseitigen t-Test ergab bei Laminin 5 einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Kultur von OMÄs am „Air Liquid Interface“ auf „Small Intestinal Submucosa“ (SIS)

Als weiteres Scaffold wurde in der letzten Phase dieser Arbeit eine azellularisierte Matrix aus dem Dünndarm von Schweinen „Small Intestinal Submucosa“ (SIS), die von Frau Prof. Dr. Walles, Leiterin des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt wurde, auf Eignung zur Herstellung eines Oralmukosa-Äquivalentes untersucht (Abbildung 75).



Abbildung 75:
Azellularisierte SIS-Membran zur Besiedelung mit Zellen

Dazu wurde die Membran wie in V 1.3.1 beschrieben in 1 cm x 1,3 cm Stücke geschnitten und auf der Lumenseite mit Zellen besiedelt. Es wurde die bisher erfolgreichste Kulturmethode, die Kultur am ALI (siehe V 1.3.3) eingesetzt und die OMÄs für F 21 + K 14 Tage kultiviert.

4.2.2.1 Überblick und Aufbau der OMÄs auf SIS

Anhand von HE-Färbungen von Kryoschnitten wurde zunächst der Aufbau der OMÄs auf SIS kontrolliert.

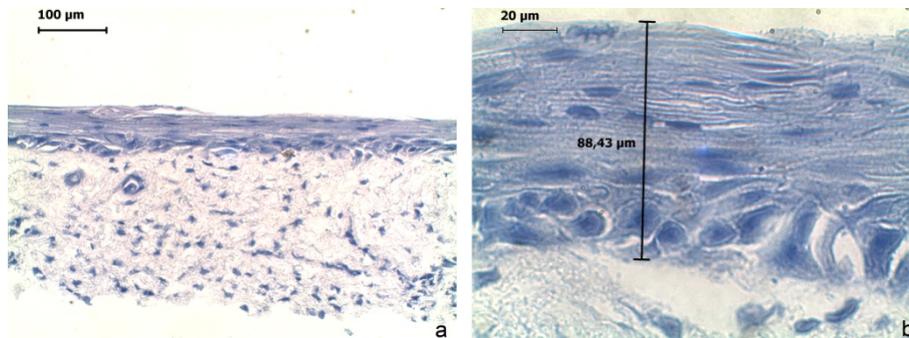


Abbildung 76:
Aufbau der OMÄs auf SIS nach einer Kulturzeit von F 21 + K 14 Tagen.
HE-Färbungen von Kryoschnitten in 100-facher (a) und 400-facher Vergrößerung (b)

Die Bilder zeigten einen gleichmäßigen Bewuchs der Membran mit Zellen. Die Fibroblasten durchzogen das gesamte Scaffold, während die Keratinozyten ein mehrschichtiges Epithel mit einer Stärke von 72 - 96 µm auf der Oberfläche der Membran ausbildeten. Wie die 400-fache Vergrößerung zeigt waren die Zellen in der Basalregion relativ groß und würfel- oder leicht säulenförmig, wie dies für basale Keratinozyten beschrieben wird. Gegen apikal flachten sie deutlich ab und bildeten viele Schichten. Die oberste Schicht begann sich bereits abzulösen (Abbildung 76 a, b).

4.2.2.2 Untersuchung zur Bildung von Proteinen der Basallamina und des Differenzierungspotentials

Für die weitere Charakterisierung der OMÄs auf Basis der SIS wurden immunhistochemischen Färbungen von Kryoschnitten durchgeführt.

CD90/Keratin 14:

In einer ersten Färbung wurden die Fibroblasten mit dem Fibroblastenmarker CD 90 angefärbt, die Keratinozyten mit dem Marker für basale Keratinozyten, Keratin 14.

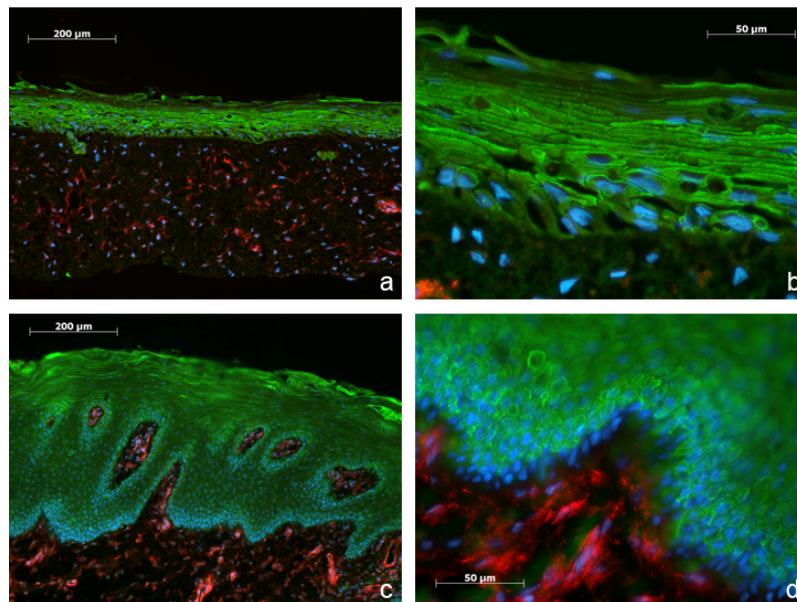


Abbildung 77:
OMÄs nach Kultur am ALI auf SIS in 100-facher (a) und 400-facher Vergrößerung (b) im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut; 100-fache (c) und 400-fache Vergrößerung (d); IIF-Färbung von CD 90, rot (Fibroblasten) und Keratin 14, grün (Keratinozyten). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)

Auch hier zeigte sich die durchgängige Epithelschicht der OMÄs aus Keratinozyten (grün) und die gleichmäßige Verteilung der Fibroblasten (rot) im Scaffold bei 100-facher Vergrößerung. Die Trennung von Dermis und Epidermis ist ebenso vorhanden (Abbildung 77 a), wie dies in normaler Mundschleimhaut vorkommt (Abbildung 77 c). Bei 400-facher Vergrößerung war zu erkennen, dass die Keratinozyten sowohl in Mundschleimhaut (Abbildung 77 d), als auch in OMÄs (Abbildung 77 b) in der Basalregion stärker angefärbt waren, als in den apikalen Bereichen, wie dies bei einem Marker basaler Keratinozyten zu erwarten war.

Die Bildung einer Basalmembran in OMÄs auf SIS zwischen Dermis und Epidermis wurde durch die IIF-Färbung von Kollagen IV sowie Laminin 5 nachgewiesen.

Kollagen IV:

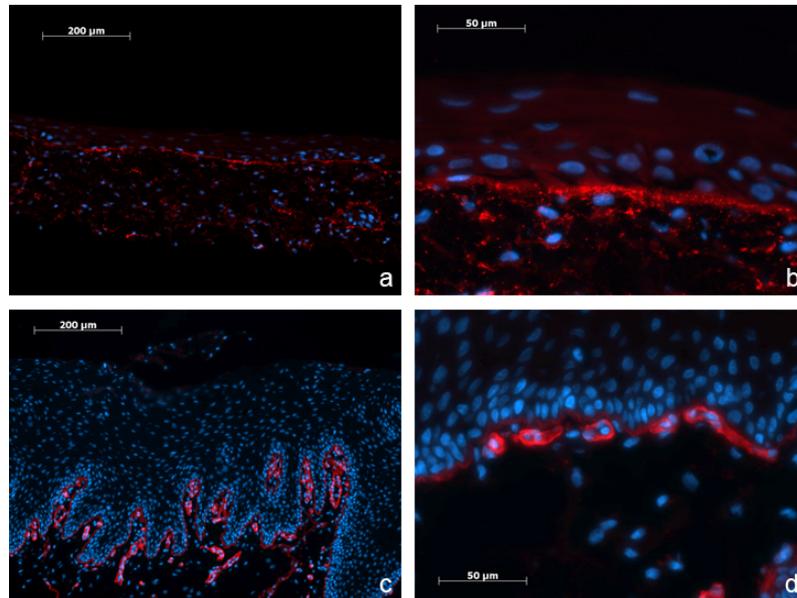


Abbildung 78:

OMÄs nach Kultur am ALI auf SIS in 100-facher (a) und 400-facher Vergrößerung (b) im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut; 100-fache (c) und 400-fache Vergrößerung (d);

IIF-Färbung von Kollagen IV (rot). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)

Die Färbung von Kollagen IV in der Basalmembranregion von OMÄs auf SIS war bei 100-facher Vergrößerung schwach zu erkennen (Abbildung 78 a), bei 400-facher Vergrößerung deutlicher (Abbildung 78 b). Auch der Vergleich mit Mundschleimhautkontrollen war möglich, hier war die Färbung lediglich ein wenig stärker (Abbildung 78 c, d).

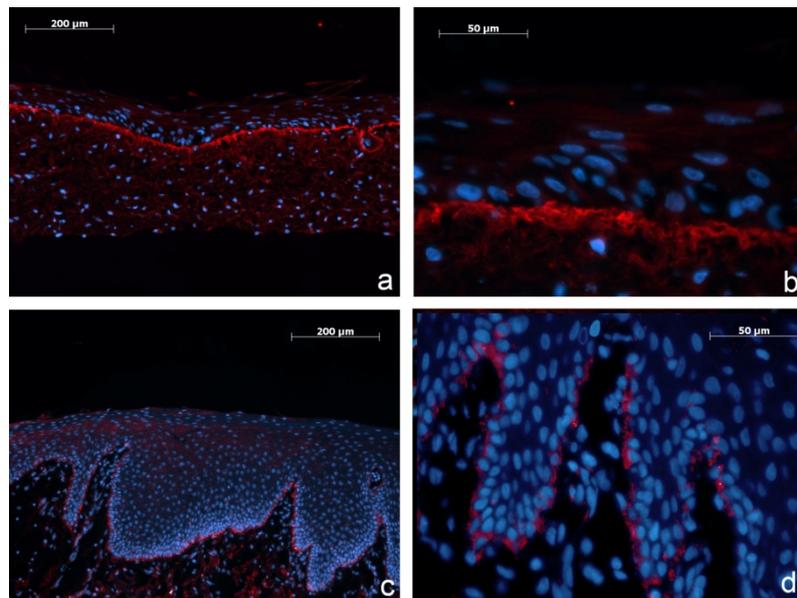
Laminin 5:

Abbildung 79:
OMÄs nach Kultur am ALI auf SIS in 100-facher (a) und 400-facher Vergrößerung (b) im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut; 100-fache (c) und 400-fache Vergrößerung (d); IIF-Färbung von Laminin 5 (rot). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)

Die Bildung von Laminin 5 in der Basalregion von OMÄs auf SIS konnte ebenfalls anhand der IIF-Färbungen von Kryoschnitten nachgewiesen werden. Die Schicht aus Laminin 5 war sehr gleichmäßig zwischen den beiden Zellarten zu erkennen (Abbildung 79 a, b). Die Färbung war sogar stärker als die bei Kontroll-Mundschleimhautproben. Besonders bei geringer Vergrößerung war hier wenig Laminin 5 zu erkennen, bei 400-facher Vergrößerung dagegen eine dünne Schicht (Abbildung 79 c, d).

Ki67:

Des Weiteren wurde eine IIF-Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt, um die Teilungsfähigkeit der auf den Scaffolds kultivierten Zellen zu überprüfen. Wie in III 1.2.1 erwähnt befinden sich die Proliferationsaktiven Keratinozyten in der Basalschicht des Epithels.

Dies konnte auch in den Kontrollen mit normaler Mundschleimhaut durch die rote Fluoreszenz gezeigt werden (Abbildung 80 d - f). Wesentlich stärker war dieser Effekt jedoch bei den OMÄs zu erkennen. Die teilungsaktiven Keratinozyten befanden sich alle in der Basalschicht der neu gebildeten Epidermis. Weiter apikal war keine Färbung sichtbar (Abbildung 80 a - c).

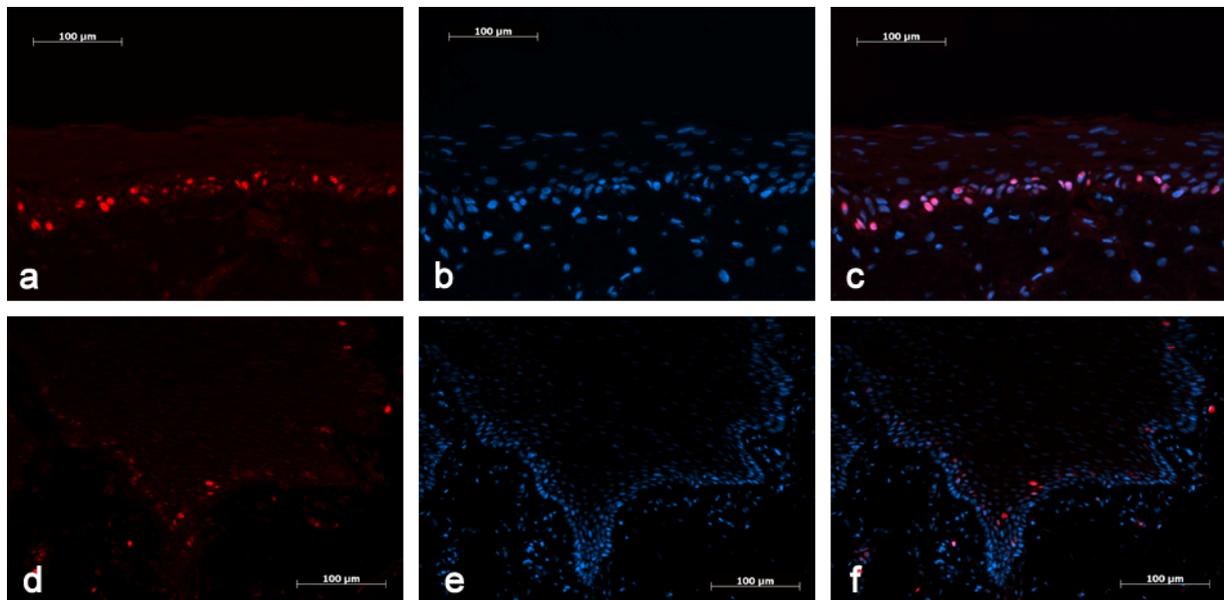


Abbildung 80:

OMÄs nach Kultur im ALI auf SIS in 200-facher Vergrößerung (a - c) im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut (d - f). IIF-Färbung von Ki67, rot (a, d). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau) (b, e) und Kombination beider Färbungen (c, f)

Keratin 13, Filaggrin:

Ebenfalls wurden die Differenzierungsmarker Keratin 13 und Filaggrin immunhistochemisch gefärbt. Hier zeigte sich nur in den Kontrollen mit normaler Mundschleimhaut ein positives Ergebnis. K13 war gleichmäßig in der äußersten Keratinozytenschicht vorhanden, Filaggrin zeigte sich nur an wenigen Stellen der äußersten Epidermis, an Bereichen die bereits dabei waren sich abzulösen, durch starke Färbung (Abbildung 81). Bei den OMÄs auf SIS war weder K13 noch Filaggrin zu erkennen, was für einen nicht differenzierten Zustand der OMÄs spricht.

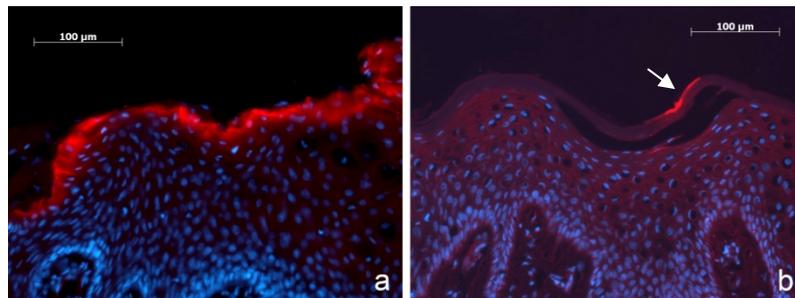


Abbildung 81:
IIF von normalen Mundschleimhautproben in 200-facher Vergrößerung;
(a): Keratin 13 (rot)
(b) Filaggrin (rot, Pfeil)
Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)

VII. Diskussion

Haut, als das mit ca. zwei Quadratmetern größte Organ des menschlichen Körpers ist das erste Organ, das mit Hilfe des *Tissue Engineerings* künstlich hergestellt wurde. Dies liegt an der guten Verfügbarkeit von Hautbiopsien sowie dem relativ einfachen zellulären Aufbau. Das vorwiegende Ziel dieser Forschung ist die Gewinnung von Transplantaten, die bei der Behandlung von Brandverletzten oder schwer heilenden Wunden zum Einsatz kommen sollen, da bei diesen Verletzungen oft nicht genug autologe Haut zur Transplantation zur Verfügung steht. Der Verlust der Barrierefunktion der Haut verursacht Dehydration und ein hohes Risiko für Infektionen (Liu et al., 2010). Neben diesem klinischen Anwendungsgebiet eignen sich Hautäquivalente ebenso als *in vitro* Test-System zur Untersuchung von Chemikalien auf schädliche Nebenwirkungen oder Fragestellungen der Grundlagenbiologie und ermöglichen die Reduktion von Tierversuchen zu diesem Zweck (Mertsching et al., 2009). Auch lieferten sie Erkenntnisse über die Wundheilung oder die Pathogenese von Hauterkrankungen wie bakterielle Infektionen (Andrian et al., 2004, Claveau et al., 2004).

Die Erfahrungen mit dem *Tissue Engineering* von äußerer Haut lassen sich auf Mundschleimhaut übertragen. Auch im Bereich der oralen Chirurgie gibt es großen Bedarf an Ersatzgewebe, sowohl als Testmodell als auch für den klinischen Einsatz zur funktionellen und ästhetischen Rekonstruktion nach Traumen und Tumorresektionen (Liu et al., 2010). Auch hier ist die Verfügbarkeit von autologer (Mundschleim-)Haut ein limitierender Faktor. Jedoch existieren zwischen Mundschleimhaut und extraoraler Haut physiologische Unterschiede wie Haarwachstum oder adnexale Strukturen sowie ein unterschiedliches Keratinisierungsmuster (Kinikoglu et al., 2009). Die gebräuchliche Methode des Einsatzes von Voll-/Spalthaut oder fasziokutanen/myokutanen Transplantaten bringt zudem die Problematik der Entnahmemorbidität mit sich. Meist ist mehr als eine Operation nötig (Alaminos et al., 2007).

Je nach Verwendungszweck des Mundschleimhautersatzes kommen verschiedene Strategien des Tissue-Engineerings zum Einsatz. Bei einem Testmodell ist es wichtig auf die Langzeitstabilität zu achten. Dazu gehört die richtige Wahl des Scaffolds. Es darf sich auch nach mehreren Wochen bis Monaten Kulturzeit nicht verändern oder gar auflösen. Die Zellen müssen ebenso über den gesamten Zeitraum vital bleiben (Boehnke et al., 2007, Moharamzadeh et al., 2008a, Moharamzadeh et al., 2009). Deshalb werden teilweise auch immortalisierte Zellen für diesen Zweck verwendet (Müssig et al., 2008, Roesch-Ely et al., 2006).

Bei einem Mundschleimhautäquivalent, das zum klinischen Einsatz gedacht ist, werden andere Prioritäten gesetzt. Hier ist das oberste Ziel, möglichst schnell ein gewebeahes Konstrukt aus autologen Zellen herzustellen, um die Verfügbarkeit für den Patienten zu gewährleisten. Auch die Wahl des Scaffolds unterscheidet sich gegenüber dem Einsatz als Testmodell. Aufgrund von möglichen Fremdkörperreaktionen der Patienten sollte das hier eingesetzte Material *in vivo* biologisch abbaubar sein. Es muss jedoch stabil genug sein, um in der *in vitro* Phase der Transplantatherstellung nicht zu degenerieren und um in der Anfangsphase nach Transplantation den natürlichen Scherkräften in der Mundhöhle stand zu halten. Obwohl intensiv auf diesem Gebiet geforscht wird, erreichte bisher keine Methode im größeren Umfang die klinische Anwendung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im Bereich oraler Gewebe das Prinzip des "Tissue Engineerings" zur Entwicklung eines möglichst gewebeahes Konstruktes aus einer biologischen Matrix mit *in vitro* kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten der Oralmukosa zum klinischen Einsatz angewendet werden.

Dazu waren zunächst die Etablierung der Isolierung, Kultivierung sowie die Charakterisierung von primären humanen Mundschleimhautzellen nötig, um grundlegende Kenntnisse dieser Zellen in Zellkultur zu erhalten. Anschließend sollte das Verhalten der verschiedenen Zellarten (Keratinozyten und Fibroblasten) in Ko-Kulturen auf verschiedenen Biopolymer-Scaffolds untersucht werden, um ein geeignetes Scaffold für das Vorhaben zu finden und den Aufbau des Ersatzgewebes zu untersuchen. Als Ausgangsgewebe dienten Mundschleimhautproben, die im Rahmen von Routineoperationen von verschiedenen Patienten für diese Forschungszwecke gespendet wurden.

1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von primären humanen Zellen der Oralmukosa

In Anlehnung an Tomakidi et al., 1997 wurde eine Methode zur Isolation von primären Mundschleimhautzellen entwickelt. Im Unterschied dazu wuchsen sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten zunächst ohne vorherige enzymatische Behandlung in DMEM/F12 Medium innerhalb von 1 - 3 Wochen aus dem Spender-Gewebe heraus. Erst bei der ersten Ernte kam Alfazyme, eine Mischung aus langen Glucanpolymeren mit einer starken negativen Ladung und Enzymen mit geringer proteolytischer sowie kollagenolytischer Aktivität zum Einsatz, um die Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen. Keratinozyten lösten sich dabei zwar von den Schalen ab, jedoch blieb die Verbindung der Zellen untereinander bestehen, was zum Ablösen eines „Zell-Häutchens“ führte. Da sich die Zellen auf diese Weise nicht zählen und neu aussähen ließen, kam als weiteres Enzym Dispase II zum Einsatz, das bei Tomakidi et al. 1997 benutzt wird, um einzelne Keratinozyten aus dem Gewebeverband zu lösen. Dieses im Vergleich zu Trypsin weniger aggressive Enzym spaltet Fibronectin, Kollagen IV und zu einem geringen Anteil Kollagen I (Stenn et al., 1989), was zu einer Suspension aus Einzelzellen führte. Diese Behandlung war bei Fibroblasten nicht nötig, da sie schon nach der Alfazyme-Inkubation in Suspension vorlagen.

Fibroblasten:

Fibroblasten konnten sowohl in DMEM als auch in DMEM/F12 Medium wachsen. Da die Dermal-Äquivalente (DÄs) sowie Oralmukosa-Äquivalente (OMÄs) jedoch in möglichst kurzer Kulturzeit hergestellt werden sollten, wurde untersucht, in welchem der beiden Medien die Zellen schneller wachsen können, um möglichst schnell möglichst viele Zellen zur Herstellung von OMÄs zur Verfügung zu haben. Dazu wurden Wachstumskurven der Zellen erstellt und das Ergebnis mittels WST-1 Assay verifiziert. Die Messungen ergaben, dass die Fibroblasten in beiden Medien gut wachsen können, in DMEM/F12 Medium jedoch etwas schneller als in DMEM Medium. Somit wurde DMEM/F12 Medium als Standardmedium für die Fibroblastenkultur eingesetzt. Es wäre denkbar die Proliferation und damit das Fibroblastenwachstum durch Mediumzusätze wie Vitamin C, TGF- β 1, Heparin, bFGF und PDGF-BB weiterhin zu steigern (Boehnke et al., 2007). Zur immunhistochemischen Charakterisierung der Zellen eigneten sich CD90 (Thy-1) sowie Vimentin (Müssig et al., 2008, Rickert et al., 2005, Tomakidi et al., 1997) als Marker für Gewebe mesenchymalen Ursprungs. Eine weitere Charakterisierung im Bezug auf das Replikationsverhalten und die *in vitro* Alterung der Fibroblasten erfolgte über die Berechnung der „cumulative population doubling levels“ (CPDLs) der Zellen. Diese zeigten ein konstantes, exponentielles Zellwachstum über einen Zeitraum von 90 Tagen über 11 Passagen hinweg. Im betrachteten Versuchszeitraum wurden CPDLs von 23 - 30 erreicht. Dies stellt jedoch nicht das

proliferative Limit der Fibroblasten dar. Es waren keine Seneszenz oder morphologische Unterschiede der Fibroblasten von Passage 1 im Vergleich zu Fibroblasten der Passage 11 zu erkennen. Somit könnten Fibroblasten auch in späten Passagen noch für Versuche eingesetzt werden. In Versuchen dieser Arbeit wurden die Zellen jedoch maximal in Passage 2 verwendet, da die OMÄs in möglichst kurzer Zeit hergestellt werden sollten und auch die Abstimmung mit den Keratinozyten aufgrund deren Proliferationslimits nur in den frühen Passagen möglich war.

Keratinozyten:

Die Kultivierung von Keratinozyten stellte in der Vergangenheit eine Herausforderung dar. Die ersten Keratinozyten in Zellkultur zeigten limitiertes Wachstum und konnten nicht passagiert werden (Mlinek and Buchner, 1975). Erst mit dem Einsatz von Feeder-Zellen (mitotisch inhibierte, murine 3T3 Zellen) gelang ihre Subkultivierung (Muller-Glauser and Preisig, 1983, Rheinwald and Green, 1975, Taichman et al., 1979). Auch heute noch kommt diese Kultivierungsmethode zum Einsatz (Kinikoglu et al., 2009), obwohl es eventuell zu einer Transfektion der Keratinozyten mit xenogener DNA kommen kann (Izumi et al., 1999). Inzwischen gibt es jedoch definierte Medien, die speziell für Keratinozyten mit verschiedenen Wachstumsfaktoren angereichert wurden, wie z. B. das KGM-Medium (Promocell) (Tomakidi et al., 1997). Mit diesen gelingt eine Kultivierung der Zellen für eine bestimmte Zeit, sogar ohne Zugabe von Serum.

Auch in dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass Einzelzellen von Keratinozyten in Standard-Medien wie DMEM oder DMEM/F12 nach der ersten Ernte nicht wachsen konnten, obwohl sie vor der ersten Passage in ihnen als „Häutchen“ aus dem Spendergewebe heraus wuchsen. Erst durch die Kultivierung in KGM-Medium, das mit Wachstumsfaktoren wie EGF oder BPE angereichert ist, wurde eine weitere Kultivierung der Zellen möglich. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnten die Zellen durch Anfärben der Proteine Keratin 5 und Keratin 14, die in basalen Keratinozyten vorkommen, charakterisiert werden (Tomakidi et al., 1997).

Ein gutes Keratinozytenwachstum wird in der Literatur auf Kulturschalen beschrieben, die mit verschiedenen Proteinen der ECM, wie verschiedene Kollagene, Laminin oder Fibronectin beschichtet waren (Arenholt-Bindslev et al., 1987, Gilchrest et al., 1980, Karasek and Charlton, 1971, Tomakidi et al., 1997). Im experimentellen Ansatz dieser Arbeit waren jedoch keine Unterschiede zum Zellwachstum auf unbeschichteten Schalen zu erkennen, so dass im Folgenden darauf verzichtet wurde.

Mögliche Kontaminationen mit parallel wachsenden Fibroblasten konnten durch Versene-Behandlung oder durch Abschaben der unerwünschten Zellart eliminiert werden, da die verschiedenen Zellarten deutliche Unterschiede in der Morphologie aufwiesen. Fibroblasten

waren spindelförmig, während Keratinozyten eine typische, kopfsteinpflasterartige Form besaßen.

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurde das Replikationsverhalten und die Alterung der Keratinozyten *in vitro* über die Bestimmung der CPDLs untersucht. Die in dieser Arbeit verwendete Keratinozyten konnten im Vergleich zu Literaturwerten ähnlich lange (ca. 50 Tage) und über 7 - 15 Passagen hinweg kultiviert werden. Die berechneten CPDLs waren mit 9 - 21 jedoch geringer als die in der Literatur angegebenen Werte von 18 - 27 (Kang et al., 2000). Dies ist darauf zurück zu führen, dass es sich um ein Gemisch aus epithelialen Keratinozyten handelt. Hier wäre eine Isolierung adulter epithelialer Stammzellen möglich, wie es bereits in der Literatur durch verschiedene Methoden beschrieben wird (Fujimori et al., 2009, Izumi et al., 2007, Stein et al., 2007). Diese Zellen behalten ihr Proliferationspotenzial für längere Zeit bei, haben jedoch trotzdem eine limitierte Lebensdauer. Stein et al. beschreiben 2007 z. B. die Anreicherung von Stammzellen durch ihrer Affinität zu Kollagen IV. Zellen, die innerhalb von 20 Minuten nach Aussaat an Kollagen IV-beschichtete Kulturschalen adhärirten, zeigten ein höheres proliferatives Potential, eine signifikant höhere Expression von β 1-Integrin und eine geringere Apoptose-Rate als jene Zellen, die kaum eine Adhärenz an Kollagen IV zeigten.

Izumi et al. sortierten 2007 ihre Keratinozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS) der Größe nach und erhielten Zell-Populationen aus kleinen Zellen (34 μ m Zelldurchmesser), die mutmaßlich mit Progenitor- bzw. Stammzellen angereichert waren und somit ein höheres Proliferationspotential besaßen, wie es sich durch längere Kulturzeiten und höhere CPDL-Werte im Vergleich zu Populationen aus mittelgroßen (46 μ m Zelldurchmesser) bzw. großen (61 μ m Zelldurchmesser) Zellen zeigte. Die Größenunterschiede epidermaler Stammzellen zu normalen Keratinozyten wurden auch von Fujimori et al. genutzt. Sie entwickelten 2009 eine Methode zur Anreicherung von Progenitor-/Stammzellen durch zweimalige Filtration der gezüchteten Keratinozyten zuerst durch einen 20 μ m, dann durch einen 11 μ m Filter.

Die proliferationsfähigeren Keratinozyten zeigten eine kleinere Morphologie, was mit den Größenunterschieden der in dieser Arbeit verwendeten Keratinozyten der frühen und späten Passagen übereinstimmt. Die proliferationsfreudigen Zellen der frühen Passagen waren klein und hatten eine polygonale Form. Zellen der späteren Passagen (ab Passage 5), die deutlich langsamer wuchsen, waren größer und enthielten runde, vakuolenartige Hohlräume im perinucleären Zytoplasma. Diese Beobachtung wurde bereits 2000 von Kang et al. beschrieben und konnte durch Größenmessungen im Zellzählgerät bestätigt werden. Dies führte dazu, dass nur kleine Zellen der ersten, maximal der zweiten Passage für Versuche verwendet wurden.

Ein Problem der Stammzellisolierung bzw. Anreicherung besteht jedoch darin, dass bisher keine spezifischen Marker für epitheliale Stammzellen gefunden wurden. Die in der Literatur

verwendeten Marker, wie eine erhöhte β 1-Integrin-Expression oder eine verringerte PPAR γ -Expression (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*), ein nucleärer Transkriptionsfaktor, der an der Epithelialen Differenzierung beteiligt ist, weisen jedoch auf Stammzeleigenschaften hin und werden zur Charakterisierung dieser Zellen eingesetzt (Izumi et al., 2007). Andere Veröffentlichungen beschreiben den Transkriptionsfaktor p63, ein Homologon des Tumorsuppressors p53 (McKeon, 2004, Pellegrini et al., 2001) oder ein spezielles Cytokeratin: K19 (Izumi et al., 2000) als potentiellen Marker.

Die Epidermis von Haut und Mundschleimhaut besteht jedoch nicht nur aus sich teilenden Keratinozyten, wie sie in der Basalschicht des Epithels vorkommen. Die Keratinozyten differenzieren während sie die verschiedenen Schichten des Epithel von basal nach apikal passieren, bevor sie sich letztendlich im Stratum corneum oder Stratum superficiale abschuppen. Dabei ist eine feine Balance zwischen sich teilenden und differenzierenden Zellen nötig. Zu starke Zellproliferation zulasten der Differenzierung kann zu unkontrolliertem Wachstum führen und in hyperproliferativen Krankheiten enden, während zu starke Differenzierung zulasten der Zellteilung in einer dickeren Haut und vorzeitiger Alterung endet (Fuchs, 1990). Dieser Prozess wird *in vivo* durch verschiedene Faktoren wie EGF, TGF α , TGF β , Retinoide (Vitamin A) kontrolliert (Fuchs, 1990) und soll *in vitro* mit Hilfe spezifischer Zusätze und einer bestimmten Kalziumkonzentration in einem Differenzierungsmedium nachgeahmt werden, um die Differenzierung der Zellen auszulösen. Besonders eine Erhöhung der Kalziumkonzentration im Vergleich zum Wachstumsmedium scheint ein Initiator der terminalen Differenzierung zu sein (Boyce and Ham, 1983). Wie bei Moharamzadeh et al., 2008a wurde in dieser Arbeit Green's Medium (GM) als Differenzierungsmedium verwendet. In diesem sind neben FCS, Antibiotika und Fungizone die Mediumzusätze EGF, Hydrocortison, Adenin, Insulin, Transferrin und Triiodothyronin enthalten. Die Kalziumkonzentration beträgt 1,72 mM und ist somit deutlich höher als im Wachstumsmedium KGM mit 0,15 mM. Auch Izumi et al. erhöhten 1999 die Kalziumkonzentration in ihrem MCDB 153-Medium zur Differenzierung von 0,15 mM auf 1,8 mM.

Die *in vitro* Differenzierung der Keratinozyten in GM konnte in dieser Studie in Zellkulturversuchen mittels RT-qPCR bestätigt werden. Eine Erhöhung der Expression des Differenzierungsmarkers K13 konnte im Differenzierungsmedium GM im Vergleich zur Expression im Wachstumsmedium KGM zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt werden. Auch morphologische Unterschiede der Zellen waren nach Wachstum in den verschiedenen Medien zu erkennen. In KGM waren die Zellen deutlicher abgegrenzt als in GM. Im Differenzierungsmedium war eine gute Vernetzung der Zellen zu erkennen, was auf viele Zell-Zellkontakte hinweist. Eine erneute Passagierung der in GM gewachsenen Zellen war

aufgrund der starken Adhäsion der Zellen untereinander nicht möglich. Auch wuchsen die Zellen nur bei hohen Zellkonzentrationen konfluent. Wurden die Zellen zu dünn ausgesät entstanden Löcher im Zellrasen, die auch bei längerer Kulturzeit nicht mehr aufgefüllt wurden.

Ein Nachteil des verwendeten Green's Medium ist in der Verwendung von FCS als Mediumzusatz zu sehen. Das Serum enthält als chemisch schlecht definierte, tierische Substanz unbekannte Faktoren, die Schadstoffe oder Krankheitserreger enthalten können, die z. B. „Slow Virus“ Erkrankungen wie BSE oder die Creutzfeld Jakob Krankheit auslösen können (Izumi et al., 1999, Feinberg and Izumi, 2005). Auch von allergischen Reaktionen wurde bereits berichtet (Izumi et al., 2000, Eder and Falkner, 2009).

Deshalb wurde versucht ein Medium ohne FCS zu finden, in dem die Keratinozyten ebenso gut wie in GM differenzieren können. In Frage kam das Wachstumsmedium KGM, das mit CaCl_2 auf eine Konzentration von 1,8 mM angereichert wurde. Ebenso kam ein Medium zum Einsatz, dem im Austausch für FCS fünfprozentiges, humanes Serumalbumin, das am häufigsten vorkommende Plasmaprotein des menschlichen Blutes, zugesetzt wurde. In einem weiteren Medium wurde auf FCS in GM ersatzlos verzichtet, da Izumi et al. 2000 berichteten, dass auf FCS bei der Aussaat der Zellen ganz verzichtet werden kann.

Die Untersuchung der Zellmorphologie nach 5 Tagen zeigte, dass das Zellwachstum in $\text{KGM} + 1,8 \text{ mM CaCl}_2$ und $\text{GM} + \text{Humanalbumin}$ dem Wachstum in $\text{GM} + \text{FCS}$ ähnelte. Auch hier waren die Zellen stark miteinander verbunden und wuchsen bei dünner Aussaat nicht bis zur Konfluenz. In GM ohne FCS konnten die Zellen nicht wachsen.

Bei einer Betrachtung über einen längeren Zeitraum (9 d) zeigte die Anfertigung von Wachstumskurven das beste Zellwachstum nach dem Wachstum in KGM (Kontrolle) in $\text{KGM} + 1,8 \text{ mM CaCl}_2$. In GM wuchsen die Zellen in den Kulturschalen neun Tage lang kontinuierlich, jedoch langsamer als in KGM bzw. $\text{KGM} + 1,8 \text{ mM CaCl}_2$. Humanes Serumalbumin eignete sich nicht als FCS-Ersatz in GM. Hier war wenig Wachstum zu erkennen. In GM ohne FCS wuchsen die Zellen nicht.

Das Medium $\text{KGM} + 1,8 \text{ mM CaCl}_2$ wurde in späteren Versuchen zur Transplantatherstellung getestet. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Keratinozyten in diesem Medium nicht fähig sind eine zusammenhängende, stratifizierte Epithelschicht zu bilden. Da auch Fibroblasten schlechter in ihm wachsen konnten als in GM blieb GM trotz des FCS-Zusatzes das Differenzierungsmedium der Wahl in dieser Arbeit.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen wäre für einen klinischen Einsatz autologes Patientenserum aus Blut zu gewinnen und dieses als Medium-Zusatz zu verwenden, wie es von Sauerbier et al. 2006 beschrieben wurde.

2. Generierung von Dermal- und Oralmukosa-Äquivalenten

2.1 Auswahl der Scaffolds

Zunächst wurden geeignete Scaffolds zur Entwicklung von Dermal-Äquivalenten ausgewählt. In der Literatur werden verschiedene Ansätze beschrieben, wobei generell zwei verschiedene Zellunterlagen unterschieden werden. Zum einen werden gelartige Scaffolds verwendet, in welche Fibroblastensuspensionen eingegossen werden bevor Keratinozyten auf die Oberfläche aufgesät werden (Alaminos et al., 2007, Tomakidi et al., 1997). Zum anderen werden stabile Biopolymer-Membranen verwendet, auf die zunächst Fibroblasten und in einem zeitlichen Abstand Keratinozyten oder nur Keratinozyten gesät werden (Kinikoglu et al., 2009, Moharamzadeh et al., 2007). Als Gele eignen sich sowohl Matrices aus Kollagen I oder Fibrin-Agarose, wie sie von Tomakidi et al. 1997 und Alaminos et al. 2007 verwendet werden. Trotz des guten zellulären Aufbaus der erhaltenen organotypischen Kokulturen ist eine Transplantation solcher Konstrukte schwer vorstellbar, da diese aufgrund ihrer fragilen mechanischen Struktur Probleme bei der Handhabung mit sich bringen. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf gelartige Unterlagen verzichtet. Als stabile Membran für die Entwicklung von OMÄs für den klinischen Einsatz kommt laut Kinikoglu et al., 2009 eine Membran aus Collagen-GAG-Chitosan in Frage. Hier können zum einen Fibroblasten einwachsen, zum anderen Keratinozyten auf der Oberfläche eine Epithelschicht bilden. Allerdings ist die benötigte Kulturzeit mit insgesamt 5 Wochen nur für das Transplantat ohne Einbezug der vorherigen Zellisolierung und Vermehrung sehr lang. Ebenso eignen sich Membranen aus Kollagen I (Sauerbier et al., 2006) oder azellularisierter Leichen- (Izumi et al., 1999) bzw. Schweinehaut (Xiong et al., 2008) zur Entwicklung von Mundschleimhauttransplantaten. Auf diesen Scaffolds wurden jedoch bisher lediglich Keratinozyten zur Bildung einer Epithelschicht ausgesät. Klinische Studien zeigen gute Ergebnisse nach Transplantation, obwohl die dermale Komponente dieser Konstrukte fehlt (Izumi et al., 2003, Sauerbier et al., 2006). Eine Optimierung ist jedoch vorstellbar, da der positive Effekt einer vorhandenen dermalen Komponente auf die Epithelzellen bekannt ist (Boehnke et al., 2007, Maas-Szabowski et al., 1999, Smola et al., 1998).

In dieser Arbeit wurden Scaffolds aus Kollagen I (TFE), Kollagen-Glukosaminoglycan (DRT), Polyglactin 910 (Vicryl), azellularisiertem Schweinedarm (SIS), Polylaktid (PLA), Alginat und Hyaluronsäureester (HYAFF) verwendet. Bei den kommerziell erhältlichen Produkten wurde auf deren klinische Zulassung, sowie die Fähigkeit zur Resorption im Körper in angemessener Zeit geachtet. Dazu sollte die Stabilität über den *in vitro* Versuchszeitraum in Zellkulturbedingungen gegeben sein. Dabei stellte sich heraus, dass die Alginat-Membran

sowie die Membran aus Hyaluronsäure für eine Besiedelung mit Mundschleimhautzellen nicht geeignet waren, da sie sich in Zellkulturmedium innerhalb weniger Stunden auflösten. Auch das PLA-Vlies veränderte sich kurz nachdem es mit Medium in Kontakt gebracht wurde. Im Gegensatz zu den beiden anderen Membranen kontrahierte es jedoch und wurde hart und unflexibel. Daher ist es für eine Trägerfunktion mit späterer Implantation ebenso ungeeignet obwohl von Smeets et al. 2006 gutes Zellwachstum auf diesem Material beschrieben wurde.

Die weiteren Versuche wurden deshalb mit den Membranen TFE, DRT, Vicryl und im späteren Verlauf mit SIS durchgeführt, die sich am geeignetsten für eine Besiedelung mit Zellen herausstellten.

Zunächst wurde die Oberfläche der verwendeten Scaffolds mittels Elektronenmikroskopie charakterisiert. Aufgrund der verschiedenen Oberflächenbeschaffenheiten war auch ein unterschiedliches Zellwachstum auf den Unterlagen zu erwarten. Die Dicke der Membranen und die Eignung zur Kryosektion wurden anhand von Kryopräparaten geprüft. Lediglich die Verarbeitung der Vicryl-Membran war schwierig, da die einzelnen Vicrylfasern nach der Kryosektion zerfielen.

2.2 Entwicklung von Dermal-Äquivalenten

Um die Biokompatibilität der Scaffolds zu überprüfen und eine geeignete Zellzahl zur Entwicklung von Dermal-Äquivalenten zu finden wurden zunächst verschiedene Fibroblastenkonzentrationen auf die Scaffolds ausgesät und das Zellwachstum durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten kontrolliert.

Alle verwendeten Zellträger wurden gut bewachsen und waren somit biokompatibel, eine Zunahme der Zellen konnte bei längerer Kulturzeit beobachtet werden. Die Kryoschnitte zeigten jedoch Zellwachstum lediglich auf der Scaffold-Oberfläche. Es war keine Migration in die Membranen zu erkennen. Nach einer Kulturzeit von einer Woche war bei der kleinsten verwendeten Zellkonzentration von $1E5$ Zellen/cm² noch kein gleichmäßiger Zellbewuchs auf den Membranen vorhanden. Sie stellte sich somit als zu gering heraus. Die Kultur der beiden höheren Konzentrationen von $2E5$ /cm² und $4E5$ /cm² ergaben ähnliche Ergebnisse, nämlich die Bildung einer Fibroblasten-Schicht auf der Membran-Oberfläche. Somit wurde die Zellzahl von $2E5$ /cm² für die weiteren Versuche ausgewählt, da auf diese Weise eine größere Fläche mit Fibroblasten besiedelt werden konnte. Auch Boehnke et al. benutzten 2007 diese Fibroblastenkonzentration. Allerdings erfolgte hier die Einsaat der Fibroblasten als Zellsuspension in einem Fibringel auf ein Gerüst aus Hyalograft-3D, da die Fibroblasten ohne eine zusätzliche Matrix nur unzureichend im Gerüst gebunden wurden. Auch wurde

keine Vorkultivierung der Fibroblasten durchgeführt, Keratinozyten wurden sofort nach festwerden des Gels aufgesät. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass auch mit geringeren Einsaatdichten gute Ergebnisse erzielt werden können, so lange auf Fibroblasten nicht ersatzlos verzichtet wird. Andere Studien zeigten, dass sich eine hohe Fibroblasten-Einsaatdichte und Vorkultur in Dermal-Äquivalenten äußerer Haut positiv auf die Keratinozytenpoliferation (el-Ghalbzouri et al., 2002) oder die dermale Regeneration nach Transplantation in Tierversuchen auswirkt (Lamme et al., 2000).

Da die natürliche Gewebearchitektur nachgeahmt werden sollte, wurde erwartet, dass Fibroblasten in die Membran hineinwachsen, Keratinozyten dagegen eine Schicht auf ihrer Oberfläche ausbilden. Da dies zu diesem Zeitpunkt nicht der Fall war, wurden verschiedene Aussaattechniken wie eine Zentrifugation der Fibroblasten in die Scaffolds oder das Durchsaugen der Zellen mittels einer Vakuum-Pumpe durch die Scaffolds getestet, um das gewünschte Ergebnis zu erreichen. Bei keiner der verwendeten Methoden zeigte sich jedoch ein Zellwachstum innerhalb der Scaffolds. Daher wurden die Zellen weiterhin ohne besondere Behandlung auf den Trägern ausgesät. Es war davon auszugehen, dass die Fibroblasten erst nach der Aussaat von Keratinozyten auf die Dermal-Äquivalente anfangen, in die Scaffolds zu migrieren, was sich in den folgenden Versuchen bestätigte.

2.3 Entwicklung von Oralmukosa-Äquivalenten

Im ersten Versuchsteil wurden die OMÄs submers in GM auf TFE, DRT und Vicryl, also wie Einzelzellkulturen in Schalen mit Kulturmedium bedeckt, kultiviert. Aufgrund des feuchten Milieus im Mundraum war zu erwarten, dass sich diese Bedingungen positiv auf das Ersatzgewebe auswirkten. Da Keratinozyten in Differenzierungsmedium nur ein langsames Proliferationspotential besitzen, wurde die Zellzahl der Keratinozyten so eingestellt, dass sie in Kontroll-Wells mit der Größe eines Transplantates bereits nach einem Tag konfluent waren.

Von den besiedelten Scaffolds bewahrten Vicryl und DRT ihre Stabilität über den Beobachtungszeitraum von insgesamt 21 Tagen.

Auf Vicryl können die Zellen jedoch nicht in einem natürlichen Zellmuster wachsen, was durch die Beschaffenheit der Membran verhindert wurde. Durch die Netzstruktur konnten Fibroblasten nicht in das Scaffold migrieren, sondern lediglich um die Membran herum wachsen. Dies hatte zur Folge, dass Keratinozyten auf der Oberfläche kein mehrschichtiges Epithel ausbildeten, sondern mit den Fibroblasten vermischt um die Membran herum wuchsen.

Wie erwartet war es den Fibroblasten möglich unter Kokultur-Bedingungen in die TFE-Membran zu migrieren. Die Keratinozyten konnten sich auf der Oberfläche ausbreiten

und differenzieren. Mittels IIF-Färbung konnte auch eine gleichmäßige Kollagen IV-Schicht in der Basalregion nachgewiesen werden, wie sie natürlich in Oralmukosa vorliegt. Im Gegensatz zu Sauerbier et al., 2006, die jedoch nur Keratinozyten ohne Fibroblasten auf TFE einsetzten, degenerierte die Membran gegen Ende des Versuchszeitraumes stark, besonders in den Bereichen mit großem Zellwachstum. Daher eignet sie sich nicht für einen klinischen Einsatz. Sie ist nach Ende des Versuchszeitraumes zu weich und instabil, um *in vivo* implantiert zu werden.

Die Kombination von gutem Zellwachstum mit einer Abgrenzung von Dermis und Epidermis und ausreichender Stabilität konnte nur bei DRT gezeigt werden. Diese Membran verändert sich kaum über den Versuchszeitraum hinweg. Die Fibroblasten können nach Aussaat der Keratinozyten gut in die Membran hineinwachsen, was mit deren Grobporigkeit zu erklären ist. Die Oberfläche des Scaffolds wird von einer homogenen Schicht Keratinozyten bedeckt, die eine Barriere gegenüber der Umwelt darstellt. Auch Kollagen IV-Einlagerungen konnten durch IIF-Färbung in diesem Konstrukt gezeigt werden, jedoch in geringerem Ausmaß als bei TFE.

Die in Submerskultur erhaltenen OMÄs auf DRT bildeten jedoch im Vergleich zu normaler Haut eine relativ dünne Epithelschicht. Auch die Bildung einer Basalmembran ist noch zu gering. Deshalb wurde im nächsten Schritt das OMÄ auf DRT bezüglich der Dicke der Epithelschicht optimiert. Laut Literaturangaben wirkt sich eine Luft-exponierte Keratinozyten-Kultur (ALI) positiv auf ein mehrschichtiges Wachstum des Epithels sowie dessen Differenzierung aus (el Ghalbzouri et al., 2002, Rosdy and Clauss, 1990, Rosdy et al., 1993).

Auf diese Weise hergestellte OMÄs bildeten eine deutlich dickere Epithelschicht aus als submers kultivierte Transplantate.

Die Zellarchitektur zeigte jedoch nach der ALI-Kultur auf DRT Unterschiede zu nativem Gewebe. Fibroblasten wuchsen zwar wie gewünscht in die Membran hinein und grenzten sich zu den oben aufliegenden Keratinozyten ab. Diese wuchsen jedoch nicht ausschließlich auf der Membranoberfläche und bildeten ein stratifiziertes Epithel, sondern wuchsen aufgrund der Grobporigkeit des Scaffolds weitgehend innerhalb der Membran. Durch das Umwachsen der Membranstrukturen konnten die Keratinozyten keine gleichmäßig angeordnete Epithelschicht ausbilden.

Die immunhistochemische Untersuchung zur Bildung einer Basalmembran bestätigte diese Unterschiede. Es wurde zwar Kollagen IV im Grenzbereich zwischen Dermis und Epidermis angefärbt, jedoch waren auch Kollageneinlagerungen im weiter apikal gelegenen Teil der Epidermis sichtbar, insbesondere bei Zellen, die Teile der Membran umwuchsen. Im Vergleich zu submers kultivierten OMÄs war jedoch deutlich mehr Kollagen IV zu erkennen. Ein ähnliches Bild zeigte sich nach Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67. Auch dieser

Marker zeigte die meisten gefärbten Zellkerne in der Basalschicht, einige dagegen auch in apikaleren Epidermisbereichen.

Eventuell müssten die DÄs länger vorkultiviert werden um den Fibroblasten ausreichend Zeit zu geben, um die Poren der Membran mit Zellmasse sowie ECM zu füllen. Kinikoglu et al. beschreiben 2009 eine dreiwöchige Vorkultur der Fibroblasten auf ähnlich grobporigen Kollagen-Glycosaminoglycan-Chitosan-Scaffolds zur Bildung von DÄs. Im Anschluss daran wurden die Keratinozyten auf den DÄs zunächst eine Woche submers kultiviert, bevor das OMÄ für weitere zwei Wochen am ALI kultiviert wurde. Auf diese Weise kam es zur Ausbildung eines stratifizierten Epithels auf der Membran mit Bildung einer Basalmembran, die durch IHC-Färbungen von Laminin 5 und Ki67 nachgewiesen werden kann. Ein Einwachsen der Epithelzellen in die Matrix und damit die ungleichmäßige Zellarchitektur trat hier nicht auf. Auch eine Differenzierung des Äquivalentes war durch eine Färbung von K13 zu erkennen. Für eine zügige Transplantation ist diese Methode jedoch nicht praktikabel. Der Zeitaufwand ist doppelt so hoch im Vergleich zu den Versuchen dieser Arbeit. Um die Vorkultivierungszeit der DÄs zu verkürzen könnte man das Medium mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie Vitamin C, TGF- β 1, Heparin, bFGF und PDGF-BB anreichern und so das Fibroblastenwachstum steigern. Boehnke et al. zeigten jedoch 2007, dass auf diese Weise angereicherte Medien nur geringe Effekte auf die Qualität der epidermalen Regeneration haben. Als weitere Verbesserung des Trägers wäre es denkbar, DRT als Gerüstmaterial anzusehen in das die Fibroblasten in einem Fibringel eingegossen werden. Auf ähnliche Weise stellen Boehnke et al. 2007 geeignete DÄs für Langzeithautäquivalente her. Hier kam jedoch als Gerüstmaterial Hyalograft-3D zum Einsatz.

Die Kulturmethode des ALI wurde mit einem weiteren Scaffold angewandt. Diese azellularisierte Matrix aus dem Dünndarm von Schweinen „*Small Intestinal Submucosa*“ (SIS) wurde von Frau Prof. Dr. Walles, Leiterin des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Mit dieser Membran konnte das beste Ergebnis erzielt werden. Auf der Membran befand sich ein mehrschichtiges Epithel mit regulärer epidermaler Architektur, während die Fibroblasten gleichmäßig in das Scaffold einwachsen konnten. IIF-Färbungen zeigten die Neosynthese einer Basalmembran durch Bildung von Kollagen IV und Laminin 5 im Grenzbereich der beiden Zellarten. Die Anfärbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 zeigte deutlich eine hohe Proliferation der Keratinozyten in der Basalschicht. Die Zellen teilten sich wie in oraler Mukosa auch nach Ablauf des Versuchszeitraumes in diesem Bereich. Richtung apikal nahm die Proliferationsfähigkeit ab, wie es in Oralmukosa *in vivo* der Fall ist. Das Scaffold blieb über den Versuchszeitraum stabil und liefert somit ein vielversprechendes OMÄ, bei dem ein klinischer Einsatz vorstellbar ist. Eine Anfärbung von Differenzierungsmarkern wie Keratin 13 (früher Differenzierungsmarker) oder Filaggrin (später Differenzierungsmarker) war jedoch

nicht möglich, was an der relativ kurzen Kulturzeit liegen könnte. Eine Überprüfung auf RNA-Ebene wäre möglich, um eine Differenzierung zu diesem Zeitpunkt festzustellen. Bei Brysk et al. wurden 1995 zum Teil Gene der Differenzierung von bukkaler Mucosa exprimiert, auch wenn das entsprechende Protein *in vitro* nicht zu sehen war. Im Gegensatz zum frühen Differenzierungsmarker K13 konnte vom späten Differenzierungsmarker Filaggrin auch in Mundschleimhaut-Kontrollen nur wenig angefärbt werden. Diese schwache Färbung ist charakteristisch für nicht verhorntes Epithel. Bei verhorntem Epithel wäre eine stärkere Färbung zu erwarten (Smith and Dale, 1986). Eventuell lässt sich die Differenzierung durch Zugabe weiterer Zusätze des Differenzierungsmediums GM weiter steigern und somit durch Färbungen auf der Proteinebene sichtbar machen. In der Regel zeigen Keratinozyten der Mundschleimhaut einen geringeren Differenzierungsgrad als Keratinozyten äußerer Haut, was sich jedoch auf eine höhere Proliferationsrate *in vitro* auswirkt (Gibbs and Poniec, 2000, Hata et al., 1995).

3. Molekularbiologische Charakterisierung der Oralmukosa-Äquivalente

Zur Verifizierung der histologischen Ergebnisse wurde die Methode der RT-qPCR verwendet. Da die SIS-Membran erst zu einem späteren Zeitpunkt als Material zur Verfügung stand und sich Vicryl in den histologischen Ergebnissen als ungeeignet für die Entwicklung von OMÄs herausstellte, wurden diese Analysen mit OMÄs auf TFE und DRT durchgeführt. Mit dieser Methode können Änderungen der Expression bestimmter Gene über einen definierten Zeitraum auf RNA-Ebene semiquantitativ bestimmt werden. Für die Genexpressionsanalyse wurden verschiedene Markergene ausgewählt, um die Bildung einer Basalmembran (Schneider et al., 2010) bzw. die Differenzierung (Brysk et al., 1995) der OMÄs im Verlauf der Zeit (nach F 14 + K 7-tägiger bzw. nach F 21 + K 14-tägiger Kokultur) nachzuweisen. Zum Vergleich wurden nur Fibroblasten für 21 Tage oder nur Keratinozyten für 14 Tage auf die Scaffolds ausgesät, um festzustellen, ob diese Einzelkulturen Unterschiede zur Kokultur mit beiden Zellarten ergeben oder um festzustellen welches Gen von welcher Zellart exprimiert wird. Dabei entspricht die Summe der 21-tägigen Fibroblasten-Kulturen und der 14-tägigen Keratinozyten-Kulturen der gleichen Zellzahl und den gleichen Wachstumszeiten wie die F 21 + K 14-tägige Kokultur aus Fibroblasten und Keratinozyten.

Bei der Isolation der gesamt-RNA der OMÄs zur Herstellung von cDNA ergab sich generell eine größere RNA-Menge bei OMÄs auf DRT als auf TFE. Bei Proben, die am ALI hergestellt wurden, konnte dies noch gesteigert werden.

Das Ergebnis lässt sich durch die größere Anzahl von Zellen erklären, die auf bzw. in DRT wachsen können. Dies bestätigt das Ergebnis, das bereits bei der Auswertung der histologischen Präparate gezeigt werden konnte. Hier waren deutlich mehr Zellen in einer dickeren Epithelschicht zu sehen, wie es durch eine gesteigerte Stratifizierung bei der Kultur am ALI zu erwarten war (Izumi et al., 1999, Parenteau et al., 1991).

3.1 Marker der Basalmembran

Als molekularer Marker für die Bildung einer Basalmembran wurden zwei Hauptbestandteile des Proteinaggregats Kollagen IV und Laminin verwendet, die oft auch in histologischen Präparaten zum Einsatz kommen (Stark et al., 2004, Tomakidi et al., 1997). Auch für Genexpressionsstudien extrazellulärer Matrixmoleküle beim *Tissue Engineering* von Haut wurden sie bereits eingesetzt (Schneider et al., 2010). Während Kollagen IV und Laminin 1 eine netzförmige Struktur ausbilden, die als Gerüst für weitere Proteine der Basalmembran dienen, ist Laminin 5 ein Schlüsselprotein der Ankerfilamente und verbindet die Basalmembran mit den Hemidesmosomen der Epithelzellen (Timpl and Brown, 1994).

Die Gene der zwei funktionell ähnlichen Proteine Kollagen IV und Laminin 1 zeigten in submers kultivierten Kokulturen ein analoges Expressionsmuster, nämlich einen Anstieg der Genexpression im Verlauf der Kulturzeit. Dies spricht für eine Formation der Basalmembran sowohl auf DRT als auch auf TFE im Verlauf der Zeit und damit für eine Reifung der OMÄs. Es zeigte sich eine deutlich stärkere Kollagen IV-Expression bei Verwendung von TFE als von DRT, was mit der in histologischen Präparaten gezeigten besseren Zellarchitektur auf dieser Membran zu erklären ist. Dagegen war die Laminin 1-Expression auf DRT marginal höher als auf TFE. Während Kollagen IV hauptsächlich in Kokulturen exprimiert wird, kann Laminin 1 auch in Einzelkulturen von Fibroblasten exprimiert werden. Da dieser Wert höher ist als der in Kokulturen, kann man auf einen inhibierenden Effekt der Keratinozyten auf die Laminin 1-Expression der Fibroblasten schließen.

Ein gegenteiliges Expressionsmuster zeigte sich bei Laminin 5. Hier nahm die Expressionsstärke im Verlauf der Kulturzeit ab. Dies könnte daran liegen, dass die meisten Zellen der dünnen Epithelschicht nach F 14 + K 7-tägiger Kultur mit der Grenze zwischen Epithel und Dermis in Kontakt kamen und deshalb viele Ankerfilamente ausgebildet wurden. Mit Anstieg der Epitheldicke nach längerer Kulturzeit konnte nur die unterste Zellschicht der Epidermis Ankerfilamente ausbilden und somit Laminin 5 exprimieren, weiter apikal gelegene Epithelschichten dagegen nicht. In Einzelkulturen zeigt sich ein hoher Expressionswert bei Keratinozyten. Auch in diesem Fall liegt der Wert deutlich höher als in den Kokulturen, was für eine Inhibition der Laminin 5-Expression durch die Fibroblasten spricht und somit die Bildung eines balancierten Verhältnisses der Laminin 5-Expression bei Kokulturen. Fibroblasten dagegen exprimieren kein Laminin 5 in Einzelkulturen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Aussage von Marionnet et al., 2006, dass sich die Expression des für die Laminin 5-Isoform verantwortlichen Gens auf Keratinozyten beschränkt.

Die Expression aller drei Marker der Basalmembran konnte bei Kulturen auf DRT mit Hilfe der Kulturmethode des ALI gesteigert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die histologischen Ergebnisse, die ebenfalls eine größere Kollagen IV-Bildung bei dieser Kulturmethode zeigten.

3.2 Marker der Differenzierung

Auch das Differenzierungspotential der OMÄs wurde neben der Fähigkeit zur Bildung einer Basalmembran mittels RT-qPCR untersucht. Als molekularer Marker der Keratinozytendifferenzierung diente K13, das zusammen mit K4 in suprabasalen Zellen exprimiert wird und häufig als Differenzierungsmarker in der Histologie (Kinikoglu et al., 2009, Moharamzadeh et al., 2008a) oder für Genexpressionsanalysen oraler Epithelien verwendet wird (Brysk et al., 1995). Zum Vergleich wurde die Expression von K14 überprüft,

die zusammen mit der Expression von K5 vorwiegend in undifferenzierten, sehr teilungsaktiven Keratinozyten der Basalschicht stattfindet (Tomakidi et al., 1997). Zu erwarten war hier ein Anstieg der Expression von K13 mit der Kulturzeit, der mit einer Abnahme der K14 Expression aufgrund der Zellalterung korreliert. Es zeigte sich jedoch die Abnahme beider Expressionsmarker im Verlauf der Zeit. Dies spricht dafür, dass die Kulturzeit von F 14 + K 7 Tagen ausreicht, um eine Differenzierung der Zellen zu erhalten, die jedoch aufgrund der Zellalterung und damit der abnehmenden Stoffwechsellistung nach F 21 + K 14 Tagen nicht mehr gesteigert, sondern verringert wird.

Auch wäre vorstellbar, dass die Proteine nach längerer Kulturzeit nicht mehr so stark exprimiert werden, weil sie zu diesem Zeitpunkt schon vorhanden sind. Um dies zu überprüfen wäre eine Untersuchung der Marker auf Proteinebene möglich.

Die Fibroblasten-Einzelkulturen exprimierten, wie erwartet, keine Keratine im Gegensatz zu Keratinozyten-Einzelkulturen. Besonders K14 wurde hier stärker exprimiert als in den Kokulturen, was wieder für einen inhibierenden Effekt der Fibroblasten auf diesen Marker spricht.

Laut Literaturangaben wirkt sich eine Luft-exponierte Kultur der OMÄs nicht nur positiv auf ein mehrschichtiges Wachstum des Epithels, sondern auch auf dessen Differenzierung aus (el Ghalbzouri et al., 2002, Rosdy and Clauss, 1990, Rosdy et al., 1993). Daher wurde diese Kulturmethode bei der Kultur von OMÄs auf DRT, dem zu diesem Zeitpunkt besten Träger, eingesetzt. Es konnte jedoch nur die Expression des Markers basaler Zellen, K14 gesteigert werden, die Expression von K13 war sogar verringert. Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis und damit das geringe Differenzierungspotential mit dem Aufbau der Epithelschicht nach der Kultur am ALI auf DRT zu erklären. Die Keratinozyten wuchsen mit dieser Methode aufgrund der Grobporigkeit der Membran nicht nur auf ihr und bildeten dort gestaffelte Schichten, sondern hauptsächlich in sie hinein und um die vielen internen Membranstrukturen herum. Jede dieser Strukturen stellt eine Barriere für die Keratinozyten dar und stört sie somit bei der Bildung eines mehrschichtigen Aufbaus. Dafür sprechen auch die immunhistochemischen Färbungen von Kollagen IV und Ki67, da diese Proteine nicht in linearer Anordnung in der Basalmembranzzone vorkamen, sondern über die Epithelschicht verteilt vorlagen. Somit wurde der mehrschichtige Aufbau des Epithels gestört und es kam weder zu einer gleichmäßigen Anordnung von Proteinen der Basalmembran in der Zone zwischen Dermis und Epidermis noch zu einer Differenzierung der Keratinozyten, die mit Mundschleimhaut vergleichbar wäre. Wenn sich alle Keratinozyten, die direkten Kontakt zur Membran haben, wie basale Keratinozyten verhalten, kann keine Differenzierung der Zellen ausgelöst werden und somit eine noch geringere Genexpression der Differenzierungsmarker vorliegen als bei Submerskulturen.

4. Fazit

In dieser Arbeit sollte eine Methode zur Herstellung von OMÄs im *Tissue-Engineering* Verfahren für einen klinischen Einsatz etabliert werden. Dazu wurden zunächst Methoden zur Isolierung und Kultivierung primärer, oraler Fibroblasten bzw. Keratinozyten entwickelt. Zur Ermittlung eines geeigneten Scaffolds wurden vorerst die Unterlagen Vicryl, DRT und TFE in Zellkulturversuchen verwendet, die aufgrund ihrer Materialeigenschaften verschiedene Vor- und Nachteile mit sich brachten. Entweder waren sie über den Versuchszeitraum unter Zellkulturbedingungen stabil, oder sie zeigten eine gute Zellarchitektur (Tabelle 22), die sowohl durch histologische als auch molekularbiologische Analysen gezeigt werden konnte. Am besten waren beide Eigenschaften auf DRT vereint, jedoch war das Ergebnis gerade im Bezug auf die Dicke der Epithelschicht sowie deren Differenzierung und Ausbildung einer Basalmembran noch zu verbessern. Dies war mit der Kulturmethode an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche möglich, jedoch konnte noch immer kein optimales Ergebnis erreicht werden. Den Beweis, dass die entwickelte Methode zur Herstellung eines OMÄs funktioniert lieferte der Einsatz der SIS-Membran. Diese Membran ist aufgrund ihres natürlichen, porcinen Ursprungs ähnlich strukturiert wie humane Submukosa. Auf ihr war die Herstellung eines Transplantates möglich, das eine mit normaler Oralmukosa vergleichbare Zellarchitektur mit dermalen und epidermalen Komponenten aufwies. Auch die Stabilität während des Versuchszeitraumes war gegeben. Die Bildung einer Basalmembran konnte mittels IIF-Färbung nachgewiesen werden. Die Proliferation der Keratinozyten war in der Basalschicht lokalisiert und nahm Richtung apikal ab. Lediglich eine Differenzierung der Epithelschicht des Transplantates war mittels immunhistochemischer Methoden nicht nachweisbar.

Auf diese Weise konnte in der vorliegenden Arbeit ein OMÄ auf Basis von SIS entwickelt werden, dessen klinischer Einsatz zur Defektdeckung und intra-oralen Rekonstruktion gut vorstellbar ist. Auch die Weiterentwicklung des OMÄ auf Basis von DRT ist für diesen Bestimmungszweck denkbar.

Tabelle 22: Eignung der verwendeten Scaffolds zur Herstellung von OMÄs

Scaffold	Stabilität	Zellarchitektur	Basalmembran/ Differenzierung
Vicryl	+++	-	-
DRT	+++	+	+
TFE	-	++	++
SIS	+++	+++	+++

5. Ausblick und Perspektiven

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage zur Optimierung und Verwirklichung des klinischen Einsatzes von mittels *Tissue Engineering* hergestellten OMÄs. Da der Erfolg einer Transplantation auch von der Vaskularisierung eines Transplantats und damit der Anbindung an die Blutversorgung abhängt (Finkenzeller et al., 2007), wurde bereits ein Versuch unternommen mvECs aus Mundschleimhautproben zu isolieren, mit dem Ziel diese als zusätzliche Komponente in den Dermisteil der OMÄs mit einzusäen. Die Menge an Zellen, die mit dieser Methode erhalten wurde, war jedoch für eine weitere Kultivierung bzw. für einen Einsatz für OMÄs zu gering. Es ist vorstellbar den Versuch mit größeren Mundschleimhautproben, insbesondere einem größeren Dermisteil zu optimieren oder weitere Methoden, wie die Isolierung von mvECs mit Hilfe einer immunomagnetischen Anreicherung (Richard et al., 1998) zu testen. Ebenso wäre es möglich EPCs aus autologem Blut zu isolieren (Fuchs et al., 2006), da diese Zellen ebenfalls ein großes Potential zur Stimulation einer Neovascularisation in Ersatzgewebe haben (Finkenzeller et al., 2007).

Gerade die Kultur von OMÄs auf SIS bietet eine weitere Möglichkeit der Anbindung eines Transplantates an die Blutversorgung. Neben der Herstellung dieser azellularisierten porcinen Membran hat die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Walles eine Trägerstruktur mit einem integrierten funktionellen Blutgefäßsystem aus porcinem Dünndarm nach Entfernung aller zellulären Komponenten (vaskularisierte Matrix, BioVaSc) zur Herstellung von komplexen vaskularisierten menschlichen Geweben mittels *Tissue Engineering* entwickelt (Linke et al., 2007, Mertsching et al., 2005, Schultheiss et al., 2005). Dabei bleiben der arterielle Zufluss, der venöse Rückfluss und das kapillare Röhrensystem erhalten, die über die Arterie mit endothelialen Vorläuferzellen (EPC) besiedelt werden können. Es entsteht ein funktionelles Gefäßsystem, (Linke et al., 2007, Mertsching et al., 2005), das mittels mikrovaskulärer Anastomosierung mit den zervikalen Gefäßen des Patienten unter dem Operationsmikroskop an dessen Blutversorgung angeschlossen werden kann.

Es ist denkbar, mit dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll Fibroblasten und Keratinozyten auf die Matrix im Bereich des nun aufgetrennten Dünndarmrohres aufzubringen und zu kultivieren. Als weiterer Ansatz könnte ein auf SIS hergestelltes, getrennt kultiviertes OMÄ durch Fixierung mit dem porcinen Träger kombiniert und im Anschluss transplantiert und anastomosiert werden.

Zukünftige Entwicklungen dieses Forschungsgebietes sind des Weiteren in der Isolation von Progenitor/Stammzellen für die zur Herstellung von verbesserten, autologen Ersatzgeweben sowie im Einsatz als Vehikel für die Gentherapie (Feinberg and Izumi, 2005) zu sehen. Die Einführung von Genen in Keratinozyten könnte die Behandlung von genetischen Hautkrankheiten verbessern, wie dies bereits zur Behandlung der Epidermolysis bullosa untersucht wird (Mavilio et al., 2006). Eine systemische Abgabe von therapeutischen

Proteinen ist denkbar, um auch Krankheiten zu behandeln, die andere Organe betreffen. Diese Methode könnte mit der Herstellung von Oralmukosa-Transplantaten kombiniert werden, um genetisch veränderte Hautäquivalente *in vitro* zu erhalten (Liu et al., 2010). Ein Vorteil zur *in vivo* Gentherapie wäre, dass Zellen viel leichter *in vitro* als *in vivo* genetisch manipuliert werden können und genügend Material aus einer kleinen Hautbiopsie erhalten werden kann, das sich vermehren lässt. Die *in vitro* Ansätze reduzieren zudem das Risiko einer systemischen Ausbreitung des zur Integration benutzten Vektors. Für eine stabile transgene Expression sollte das Gen in das Genom von epithelialen Stammzellen integriert werden, um den Verlust während des normalen Zellzyklusses vorzubeugen. Bei Anwendungen wie der Wundheilung könnte eine transiente Expression von normalen Keratinozyten ausreichen (Kikuchi et al., 2008).

Auch ist es denkbar Zellen der Mundschleimhaut bzw. deren Vorläufer oder Stammzellen für die Regeneration anderer Schleimhautdefekte wie z. B. der Augenlider, der Luftröhre, der Speiseröhre, der Blase oder des Harnleiters einzusetzen, da die Zellen gute Eigenschaften wie ein hohes proliferatives Potential sowie das Fehlen von adnexalen Strukturen wie Haare oder Talgdrüsen im Vergleich zu normaler Haut mitbringen (Feinberg and Izumi, 2005).

VIII. Literaturverzeichnis

- ALAMINOS, M., GARZÓN, I., SÁNCHEZ-QUEVEDO, M. C., MOREU, G., GONZÁLEZ-ANDRADES, M., FERNÁNDEZ-MONTOYA, A. & CAMPOS, A. 2007. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*, 1, 350--359.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2004. Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH Verlag*, 4. Auflage, 1285.
- ANDRIAN, E., GRENIER, D. & ROUABHIA, M. 2004. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 72, 4689-98.
- ANSEL, J. C., TIESMAN, J. P., OLERUD, J. E., KRUEGER, J. G., KRANE, J. F., TARA, D. C., SHIPLEY, G. D., GILBERTSON, D., USUI, M. L. & HART, C. E. 1993. Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*, 92, 671--678.
- ARENHOLT-BINDSLEV, D., JEPSEN, A., MACCALLUM, D. K. & LILLIE, J. H. 1987. The growth and structure of human oral keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol*, 88, 314--319.
- ARKONAC, B. M., FOSTER, L. C., SIBINGA, N. E., PATTERSON, C., LAI, K., TSAI, J. C., LEE, M. E., PERRELLA, M. A. & HABER, E. 1998. Vascular endothelial growth factor induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 273, 4400--4405.
- AUMAILLEY, M., BATTAGLIA, C., MAYER, U., REINHARDT, D., NISCHT, R., TIMPL, R. & FOX, J. W. 1993. Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int*, 43, 7--12.
- AVERY, J. K. 1994. Oral Development and Histology. *Thieme*, 243-249.
- BAKER, S. E., HOPKINSON, S. B., FITCHMUN, M., ANDREASON, G. L., FRASIER, F., PLOPPER, G., QUARANTA, V. & JONES, J. C. 1996. Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci*, 109 (Pt 10), 2509--2520.
- BARTH, J., RICHTER, G. & ALTMAYER, P. 1991. Dermatologie Edition Zahnheilkunde. *Johann Ambrosius Barth Leipzig Heidelberg*, 21-23.
- BEE, T. K., CROCE, M. A., MAGNOTTI, L. J., ZARZAU, B. L., MAISH, G. O., MINARD, G., SCHROEPEL, T. J. & FABIAN, T. C. 2008. Temporary abdominal closure techniques: a prospective randomized trial comparing polyglactin 910 mesh and vacuum-assisted closure. *J Trauma*, 65, 337--42; discussion 342-4.
- BICKENBACH, J. R. 1981. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res*, 60 Spec No C, 1611--1620.
- BOEHNKE, K., MIRANCEA, N., PAVESIO, A., FUSENIG, N. E., BOUKAMP, P. & STARK, H. J. 2007. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur J Cell Biol*, 86, 731-46.
- BOYCE, S. T. & HAM, R. G. 1983. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol*, 81, 33s-40s.
- BRYSK, M. M., ARANY, I., BRYSK, H., CHEN, S. H., CALHOUN, K. H. & TYRING, S. K. 1995. Gene expression of markers associated with proliferation and differentiation in human

- keratinocytes cultured from epidermis and from buccal mucosa. *Arch Oral Biol*, 40, 855-62.
- BUTLER, C. E., ORGILL, D. P., YANNAS, I. V. & COMPTON, C. C. 1998. Effect of keratinocyte seeding of collagen-glycosaminoglycan membranes on the regeneration of skin in a porcine model. *Plast Reconstr Surg*, 101, 1572--1579.
- CAPLA, J. M., CERADINI, D. J., TEPPER, O. M., CALLAGHAN, M. J., BHATT, K. A., GALIANO, R. D., LEVINE, J. P. & GURTNER, G. C. 2006. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plast Reconstr Surg*, 117, 836--844.
- CHAN, F. L., INOUE, S. & LEBLOND, C. P. 1993. The basement membranes of cryofixed or aldehyde-fixed, freeze-substituted tissues are composed of a lamina densa and do not contain a lamina lucida. *Cell Tissue Res*, 273, 41--52.
- CHENG, E. Y. & KROPP, B. P. 2000. Urologic tissue engineering with small-intestinal submucosa: potential clinical applications. *World J Urol*, 18, 26-30.
- CLAVEAU, I., MOSTEFAOUI, Y. & ROUABHIA, M. 2004. Basement membrane protein and matrix metalloproteinase deregulation in engineered human oral mucosa following infection with *Candida albicans*. *Matrix Biol*, 23, 477-86.
- CLUGSTON, P. A., SNELLING, C. F., MACDONALD, I. B., MALEDY, H. L., BOYLE, J. C., GERMANN, E., COURTEMANCHE, A. D., WIRTZ, P., FITZPATRICK, D. J. & KESTER, D. A. 1991. Cultured epithelial autografts: three years of clinical experience with eighteen patients. *J Burn Care Rehabil*, 12, 533--539.
- CONTARD, P., BARTEL, R. L., JACOBS, L., PERLISH, J. S., MACDONALD, E. D., HANDLER, L., CONE, D. & FLEISCHMAJER, R. 1993. Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J Invest Dermatol*, 100, 35--39.
- COOPER, M. L., ANDREE, C., HANSBROUGH, J. F., ZAPATA-SIRVENT, R. L. & SPIELVOGEL, R. L. 1993. Direct comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice. *J Invest Dermatol*, 101, 811--819.
- DABELSTEEN, S. & MACKENZIE, I. C. 2006. The stem cell concept in oral mucosa and in cancer. *Nor Tannlegeforen Tid*, 116, 32-36.
- DALE, B. A., RESING, K. A. & LONSDALE-ECCLES, J. D. 1985. Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann N Y Acad Sci*, 455, 330--342.
- EDER, C. & FALKNER, E. 2009. Ist der Einsatz von fetalem Kälberserum (FCS) noch state of the art? *MedReview*, 03, 16-17.
- EL-GHALBZOURI, A., GIBBS, S., LAMME, E., VAN BLITTERSWIJK, C. A. & PONEC, M. 2002. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol*, 147, 230-43.
- ELIAS, P. M., NAU, P., HANLEY, K., CULLANDER, C., CRUMRINE, D., BENCH, G., SIDERAS-HADDAD, E., MAURO, T., WILLIAMS, M. L. & FEINGOLD, K. R. 1998. Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J Invest Dermatol*, 110, 399--404.
- FEINBERG, S. E. & IZUMI, K. 2005. Tissue Engineering of a Human Oral Mucosa for Tissue Repair and Regeneration. *Oral Biosci Med*, 2, 147-151.
- FINKENZELLER, G., TORIO-PADRON, N., MOMENI, A., MEHLHORN, A. T. & STARK, G. B. 2007. In vitro angiogenesis properties of endothelial progenitor cells: a promising tool for vascularization of ex vivo engineered tissues. *Tissue Eng*, 13, 1413-20.

- FLORIN, L., MAAS-SZABOWSKI, N., WERNER, S., SZABOWSKI, A. & ANGEL, P. 2005. Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J Cell Sci*, 118, 1981--1989.
- FUCHS, E. 1990a. Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol*, 2, 1028--1035.
- FUCHS, E. 1990b. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*, 111, 2807--2814.
- FUCHS, E. 2008. Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol*, 180, 273--284.
- FUCHS, E. & GREEN, H. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19, 1033--1042.
- FUCHS, S., MOTTA, A., MIGLIARESI, C. & KIRKPATRICK, C. J. 2006. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials*, 27, 5399-408.
- FUJIMORI, Y., IZUMI, K., FEINBERG, S. E. & MARCELO, C. L. 2009. Isolation of small-sized human epidermal progenitor/stem cells by Gravity Assisted Cell Sorting (GACS). *J Dermatol Sci*, 56, 181-7.
- GARANT, P. R. 2003. Oral cells and tissues. *Quintessence Publishing Co, Inc*, 81-113.
- GATH, H. J. & RAGUSE, J. D. 2001. Erste klinische Ergebnisse mit einem biotechnologisch hergestellten Hautersatz (Dermagraft) in der Versorgung von Patienten mit Kopf-Hals Tumoren. *Vortrag anlässlich der Jahrestagung der DGMKG in Marburg, Charite, Augustengurjer Platz 1, 133352 Berlin*.
- GEORG, H. 1965. [Investigations on the significance of surface tension in free autoplasic full skin transplantation]. *Langenbecks Arch Chir*, 311, 356--380.
- GIANCOTTI, F. G. & RUOSLAHTI, E. 1999. Integrin signaling. *Science*, 285, 1028--1032.
- GIBBS, S., BOELSMA, E., KEMPENAAR, J. & PONEC, M. 1998. Temperature-sensitive regulation of epidermal morphogenesis and the expression of cornified envelope precursors by EGF and TGF alpha. *Cell Tissue Res*, 292, 107--114.
- GIBBS, S. & PONEC, M. 2000. Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis, hard palate and buccal mucosa. *Arch Oral Biol*, 45, 149-58.
- GIKAS, P. D., BAYLISS, L., BENTLEY, G. & BRIGGS, T. W. R. 2009. An overview of autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Br*, 91, 997--1006.
- GILCHREST, B. A., NEMORE, R. E. & MACIAG, T. 1980. Growth of human keratinocytes on fibronectin-coated plates. *Cell Biol Int Rep*, 4, 1009--1016.
- GREEN, K. J. & GAUDRY, C. A. 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 208--216.
- GÜHRUNG, W. & BARTH, J. 1992. Anatomie: Spezielle Biologie des Kausystems. *Verlag Neuer Merkur GmbH*, 115-117.
- GUMBINER, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84, 345--357.
- GÜNZEL, S., WEIDENTHALER, B., HAUSSER, I. & ANTON-LAMPRECHT, I. 1991. Keratohyalin granules are heterogeneous in ridged and non-ridged human skin: evidence from anti-filaggrin immunogold labelling of normal skin and skin of autosomal dominant ichthyosis vulgaris patients. *Arch Dermatol Res*, 283, 421--432.
- GUTWALD, GELLRICH & FISCHER 2003. Einführung in die zahnärztliche Chirurgie. *Urban & Fischer*, 246.
- HATA, K., KAGAMI, H., UEDA, M., TORII, S. & MATSUYAMA, M. 1995. The characteristics of cultured mucosal cell sheet as a material for grafting; comparison with cultured epidermal cell sheet. *Ann Plast Surg*, 34, 530-8.

- HAUBEN, D. J., BARUCHIN, A. & MAHLER, A. 1982. On the history of the free skin graft. *Ann Plast Surg*, 9, 242--245.
- HEIMBACH, D., LUTERMAN, A., BURKE, J., CRAM, A., HERNDON, D., HUNT, J., JORDAN, M., MCMANUS, W., SOLEM, L. & WARDEN, G. 1988. Artificial dermis for major burns. A multi-center randomized clinical trial. *Ann Surg*, 208, 313--320.
- HOPPE, H.-D. 2006. Wund(er)mittel Hyaluronsäure. *Die Schwester Der Pfleger*, 45. Jahrg. 5, 26-31.
- HORCH, R. E., DEBUS, M., WAGNER, G. & STARK, G. B. 2000. Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Eng*, 6, 53--67.
- HORCH, R. E., MUNSTER, A. M. & ACHAUER, B. M. 2001. Cultured human keratinocytes and tissue engineered skin substitutes. *Thieme*, 163-171.
- HUNT, N. C., SHELTON, R. M. & GROVER, L. 2009. An alginate hydrogel matrix for the localised delivery of a fibroblast/keratinocyte co-culture. *Biotechnol J*, 4, 730--737.
- IOZZO, R. V. 2005. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 646--656.
- IOZZO, R. V., COHEN, I. R., GRÄSSEL, S. & MURDOCH, A. D. 1994. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J*, 302 (Pt 3), 625--639.
- IZUMI, K., FEINBERG, S. E., IIDA, A. & YOSHIZAWA, M. 2003. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 32, 188--197.
- IZUMI, K., TAKACS, G., TERASHI, H. & FEINBERG, S. E. 1999. Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. *J Oral Maxillofac Surg*, 57, 571--7; discussion 577-8.
- IZUMI, K., TERASHI, H., MARCELO, C. L. & FEINBERG, S. E. 2000. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res*, 79, 798--805.
- IZUMI, K., TOBITA, T. & FEINBERG, S. E. 2007. Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *J Dent Res*, 86, 341--346.
- JACKOWSKI, J., PETERS, H. & HÖLZLE, F. 2007. Praxisleitfaden Zahnärztliche Chirurgie. *Elsevier GmbH, Urban & Fischer*, 1. Auflage, 290.
- KANG, M. K., BIBB, C., BALUDA, M. A., REY, O. & PARK, N. H. 2000. In vitro replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res*, 258, 288--297.
- KARASEK, M. A. & CHARLTON, M. E. 1971. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J Invest Dermatol*, 56, 205--210.
- KASPER, C. 2005. Ersatzteillager Mensch? *Chem. Unserer Zeit*, 39, 394-401.
- KEY, M. 2006. Immunohistochemical Staining Methods Educational Guide. *DAKO GmbH*, 4th Edition.
- KIKUCHI, Y., TAMAI, K. & KANEDA, Y. 2008. Cutaneous gene delivery. *J Dermatol Sci*, 50, 87-98.
- KINIKOGLU, B., AUXENFANS, C., PIERRILLAS, P., JUSTIN, V., BRETON, P., BURILLON, C., HASIRCI, V. & DAMOUR, O. 2009. Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent. *Biomaterials*, 30, 6418-25.
- KREJCI-PAPA, N. C., HOANG, A. & HANSBROUGH, J. F. 1999. Fibroblast sheets enable epithelialization of wounds that do not support keratinocyte migration. *Tissue Eng*, 5, 555--562.

- LAMME, E. N., VAN LEEUWEN, R. T., BRANDSMA, K., VAN MARLE, J. & MIDDELKOOP, E. 2000. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol*, 190, 595-603.
- LAPIERE, J. C., CHEN, J. D., IWASAKI, T., HU, L., UITTO, J. & WOODLEY, D. T. 1994. Type VII collagen specifically binds fibronectin via a unique subdomain within the collagenous triple helix. *J Invest Dermatol*, 103, 637--641.
- LAUER, G. & SCHIMMING, R. 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, 169--75; discussion 175-7.
- LEVY, L., BROAD, S., DIEKMANN, D., EVANS, R. D. & WATT, F. M. 2000. beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell*, 11, 453--466.
- LIMAT, A., MAURI, D. & HUNZIKER, T. 1996. Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells. *J Invest Dermatol*, 107, 128--135.
- LINKE, K., SCHANZ, J., HANSMANN, J., WALLE, T., BRUNNER, H. & MERTSCHING, H. 2007. Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Eng*, 13, 2699-707.
- LIU, J., BIAN, Z., KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. & VON DEN HOFF, J. W. 2010. Skin and oral mucosa equivalents: construction and performance. *Orthod Craniofac Res*, 13, 11-20.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2003. Taschenlehrbuch Histologie. *Thieme*, 342-343.
- LYNCH, S. E., GENCO, R. J. & MARX, R. E. 1999. Tissue Engineering - Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. *Quintessence Publishing Co, Inc.*
- MAAS-SZABOWSKI, N., SHIMOTOYODOME, A. & FUSENIG, N. E. 1999. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci*, 112 (Pt 12), 1843--1853.
- MACCHIARINI, P., WALLE, T., BIANCOSINO, C. & MERTSCHING, H. 2004. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128, 638--641.
- MACKENZIE, I. C. 2005. Stem cells in oral mucosal epithelia. *Oral Biosci Med*, 2/3, 95-103.
- MACKENZIE, I. C. & BINNIE, W. H. 1983. Recent advances in oral mucosal research. *J Oral Pathol*, 12, 389--415.
- MADDEN, M. R., FINKELSTEIN, J. L., STAIANO-COICO, L., GOODWIN, C. W., SHIRES, G. T., NOLAN, E. E. & HEFTON, J. M. 1986. Grafting of cultured allogeneic epidermis on second- and third-degree burn wounds on 26 patients. *J Trauma*, 26, 955--962.
- MARCACCI, M., KON, E., MOUKHACHEV, V., LAVROUKOV, A., KUTEPOV, S., QUARTO, R., MASTROGIACOMO, M. & CANCEDDA, R. 2007. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*, 13, 947--955.
- MARIONNET, C., PIERRARD, C., VIOUX-CHAGNOLEAU, C., SOK, J., ASSELINEAU, D. & BERNERD, F. 2006. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol*, 126, 971-9.
- MAVILIO, F., PELLEGRINI, G., FERRARI, S., DI NUNZIO, F., DI IORIO, E., RECCHIA, A., MARUGGI, G., FERRARI, G., PROVASI, E., BONINI, C., CAPURRO, S., CONTI, A., MAGNONI, C., GIANNETTI, A. & DE LUCA, M. 2006. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med*, 12, 1397-402.

- MCKEON, F. 2004. p63 and the epithelial stem cell: more than status quo? *Genes Dev*, 18, 465-9.
- MERTSCHING, H., KAUFMANN, M., SAXLER, J. & GEHRMANN, A.-L. 2009. Künstliche Haut - Tissue Engineering Haut aus der Maschine *labor&more*, 04/09, 6-8.
- MERTSCHING, H., WALLE, T., HOFMANN, M., SCHANZ, J. & KNAPP, W. H. 2005. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*, 26, 6610--6617.
- MESE, G., RICHARD, G. & WHITE, T. W. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127, 2516--2524.
- MINUTH, W. W., SOROKIN, L. & SCHUMACHER, K. 2004. Generation of renal tubules at the interface of an artificial interstitium. *Cell Physiol Biochem*, 14, 387--394.
- MITIC, L. L., ITALLIE, C. M. V. & ANDERSON, J. M. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279, G250-G254.
- MLINEK, A. & BUCHNER, A. 1975. In vitro cultivation of adult human gingiva I. primary epithelial outgrowth from gingival explants. *J Periodontal Res*, 10, 73-8.
- MOHARAMZADEH, K., BROOK, I. M., NOORT, R. V., SCUTT, A. M., SMITH, K. G. & THORNHILL, M. H. 2008a. Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*, 19, 1793--1801.
- MOHARAMZADEH, K., BROOK, I. M., NOORT, R. V., SCUTT, A. M. & THORNHILL, M. H. 2007. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res*, 86, 115--124.
- MOHARAMZADEH, K., BROOK, I. M., SCUTT, A. M., THORNHILL, M. H. & NOORT, R. V. 2008b. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. *J Dent*, 36, 331--336.
- MOHARAMZADEH, K., FRANKLIN, K. L., BROOK, I. M. & VAN NOORT, R. 2009. Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model. *J Periodontol*, 80, 769--775.
- MOKKAPATI, S., BARANOWSKY, A., MIRANCEA, N., SMYTH, N., BREITKREUTZ, D. & NISCHT, R. 2008. Basement membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *J Invest Dermatol*, 128, 2259--2267.
- MOSTEFAOUI, Y., CLAVEAU, I., ROSS, G. & ROUABHIA, M. 2002. Tissue structure, and IL-1beta, IL-8, and TNF-alpha secretions after contact by engineered human oral mucosa with dentifrices. *J Clin Periodontol*, 29, 1035--1041.
- MULLER-GLAUSER, W. & PREISIG, E. 1983. The effect of cholera toxin and epidermal growth factor on the in-vitro growth of human oral epithelial cells. *Arch Oral Biol*, 28, 765-71.
- MÜSSIG, E., STEINBERG, T., KOHL, A., CHAMULTRAT, W., KOMPOSCH, G. & TOMAKIDI, P. 2008. Discrimination of epithelium-like and fibroblast-like phenotypes derived from ethanol-treated immortalised human gingival keratinocytes in epithelial equivalents. *Cell Tissue Res*, 332, 57--71.
- O`CONNOR, N., MULLIKEN, J. B., BANKS-SCHLEGEL, S., KEHINDE, O. & GREEN, H. 1981. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*, 1, 75--78.
- ODIOSO, L. L., DOYLE, M. J., QUINN, K. W., BARTEL, R. L., ZIMBER, M. P. & STEVENS-BURNS, D. 1995. Development and characterization of an in vitro gingival epithelial model. *J Periodontal Res*, 30, 210--219.

- OGAWA, K., OCHOA, E. R., BORENSTEIN, J., TANAKA, K. & VACANTI, J. P. 2004. The generation of functionally differentiated, three-dimensional hepatic tissue from two-dimensional sheets of progenitor small hepatocytes and nonparenchymal cells. *Transplantation*, 77, 1783--1789.
- PANDYA, A. N., WOODWARD, B. & PARKHOUSE, N. 1998. The use of cultured autologous keratinocytes with integra in the resurfacing of acute burns. *Plast Reconstr Surg*, 102, 825--8; discussion 829-30.
- PARENTEAU, N. L., NOLTE, C. M., BILBO, P., ROSENBERG, M., WILKINS, L. M., JOHNSON, E. W., WATSON, S., MASON, V. S. & BELL, E. 1991. Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications. *J Cell Biochem*, 45, 245--251.
- PELLEGRINI, G., DELLAMBRA, E., GOLISANO, O., MARTINELLI, E., FANTOZZI, I., BONDANZA, S., PONZIN, D., MCKEON, F. & DE LUCA, M. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3156-61.
- PONEC, M., GIBBS, S., WEERHEIM, A., KEMPENAAR, J., MULDER, A. & MOMMAAS, A. M. 1997a. Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res*, 289, 317--326.
- PONEC, M., WEERHEIM, A., KEMPENAAR, J., MULDER, A., GOORIS, G. S., BOUWSTRA, J. & MOMMAAS, A. M. 1997b. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J Invest Dermatol*, 109, 348--355.
- PRESLAND, R. B. & DALE, B. A. 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11, 383--408.
- PURDUE, G. F. 1997. Dermagraft-TC pivotal efficacy and safety study. *J Burn Care Rehabil*, 18, S13--S14.
- RHEINWALD, J. G. & GREEN, H. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6, 331--343.
- RHEINWALD, J. G. & GREEN, H. 1977. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*, 265, 421--424.
- RICHARD, L., VELASCO, P. & DETMAR, M. 1998. A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*, 240, 1-6.
- RICKERT, D., LENDLEIN, A., KELCH, S., FRANKE, R. P. & MOSES, M. A. 2005. [Cell proliferation and cellular activity of primary cell cultures of the oral cavity after cell seeding on the surface of a degradable, thermoplastic block copolymer]. *Biomed Tech (Berl)*, 50, 92-9.
- RIVELINE, D., ZAMIR, E., BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., KAM, Z., GEIGER, B. & BERSHADSKY, A. D. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*, 153, 1175--1186.
- ROBERTSON, J. D., DE LA TORRE, J. I., GARDNER, P. M., GRANT, J. H., FIX, R. J. & VÁSCONEZ, L. O. 2003. Abdominoplasty repair for abdominal wall hernias. *Ann Plast Surg*, 51, 10--16.
- ROESCH-ELY, M., STEINBERG, T., BOSCH, F. X., MÜSSIG, E., WHITAKER, N., WIEST, T., KOHL, A., KOMPOSCH, G. & TOMAKIDI, P. 2006. Organotypic co-cultures allow for immortalized human gingival keratinocytes to reconstitute a gingival epithelial phenotype in vitro. *Differentiation*, 74, 622--637.

- ROSDY, M. & CLAUSS, L. C. 1990. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol*, 95, 409--414.
- ROSDY, M., PISANI, A. & ORTONNE, J. P. 1993. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br J Dermatol*, 129, 227--234.
- RZEPKA, K., SCHAARSCHMIDT, G., NAGLER, M. & WOHLRAB, J. 2005. [Epidermal stem cells]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 3, 962--973.
- SAUERBIER, S., GUTWALD, R., AL-AHMAD, M. W., LAUER, G. & SCHMELZEISEN, R. 2006. Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa. *Clin Oral Implants Res*, 17, 625--632.
- SHELLER, E. L., KREBSBACH, P. H. & KOHN, D. H. 2009. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil*, 36, 368--389.
- SCHMIDT-ROHLFING, B., TZIOUPIS, C., MENZEL, C. L. & PAPE, H. C. 2009. [Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications]. *Unfallchirurg*, 112, 785--94; quiz 795.
- SCHNEIDER, R. K., ANRATHS, J., KRAMANN, R., BORNEMANN, J., BOVI, M., KNUCHEL, R. & NEUSS, S. 2010. The role of biomaterials in the direction of mesenchymal stem cell properties and extracellular matrix remodelling in dermal tissue engineering. *Biomaterials*, 31, 7948-59.
- SCHÖNLEBEN, F., RECK, T., TANNAPFEL, A., HOHENBERGER, W. & SCHNEIDER, I. 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, 840--846.
- SCHONMEYR, B., CLAVIN, N., AVRAHAM, T., LONGO, V. & MEHRARA, B. J. 2009. Synthesis of a tissue-engineered periosteum with acellular dermal matrix and cultured mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 15, 1833-41.
- SCHULTHEISS, D., GABOUEV, A. I., CEBOTARI, S., TUDORACHE, I., WALLE, T., SCHLOTE, N., WEFER, J., KAUFMANN, P. M., HAVERICH, A., JONAS, U., STIEF, C. G. & MERTSCHING, H. 2005. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeded technique and short-term implantation in a porcine model. *J Urol*, 173, 276--280.
- SIMON, A. M. & GOODENOUGH, D. A. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol*, 8, 477--483.
- SIMON, M. & GREEN, H. 1984. Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. *Cell*, 36, 827--834.
- SMEETS, R., WIESEMANN, U., APEL, C., STOLL, C., HARWOKO, M., RIEDIGER, D., GRIES, T. & WÖLTJE, M. 2006. Textile Vliese und Gewirke zur Züchtung von Mundschleimhaut. *AVR, Reserach and Developement*, 03, 2-4.
- SMITH, S. A. & DALE, B. A. 1986. Immunologic localization of filaggrin in human oral epithelia and correlation with keratinization. *J Invest Dermatol*, 86, 168-72.
- SMOLA, H., STARK, H. J., THIEKÖTTER, G., MIRANCEA, N., KRIEG, T. & FUSENIG, N. E. 1998. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res*, 239, 399--410.
- STARK, H.-J., SZABOWSKI, A., FUSENIG, N. E. & MAAS-SZABOWSKI, N. 2004. Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated in vitro system. *Biol Proced Online*, 6, 55--60.

- STEIN, E., BLAIMAUER, K., BAUER, S., EROVIC, B. M., TURHANI, D. & THURNHER, D. 2007. High expression of integrin beta1 correlates with high proliferation capacity in oral keratinocytes. *Wien Klin Wochenschr*, 119, 318--322.
- STEINERT, P. M. & ROOP, D. R. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem*, 57, 593--625.
- STENN, K. S., LINK, R., MOELLMANN, G., MADRI, J. & KUKLINSKA, E. 1989. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol*, 93, 287-90.
- STERN, R., MCPHERSON, M. & LONGAKER, M. T. 1990. Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury. *J Burn Care Rehabil*, 11, 7--13.
- STRICKER, A., GELLRICH, N. C., SCHRAMM, A. & SCHMELZEISEN, R. 2001. Die Verwendung von TissuFoil Membran bei der Sinusbodenaugmentation. *ellipse*, 17 (1), 1-5.
- SUN, T., HAYCOCK, J. & MACNEIL, S. 2006. In situ image analysis of interactions between normal human keratinocytes and fibroblasts cultured in three-dimensional fibrin gels. *Biomaterials*, 27, 3459--3465.
- SUPP, D. M. & BOYCE, S. T. 2005. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol*, 23, 403--412.
- SZABOWSKI, A., MAAS-SZABOWSKI, N., ANDRECHT, S., KOLBUS, A., SCHORPP-KISTNER, M., FUSENIG, N. E. & ANGEL, P. 2000. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*, 103, 745--755.
- TAICHMAN, L., REILLY, S. & GARANT, P. R. 1979. In-vitro cultivation of human oral keratinocytes. *Arch Oral Biol*, 24, 335-41.
- TERADA, S., SATO, M., SEVY, A. & VACANTI, J. P. 2000. Tissue engineering in the twenty-first century. *Yonsei Med J*, 41, 685--691.
- TIMPL, R. & BROWN, J. C. 1994. The laminins. *Matrix Biol*, 14, 275--281.
- TIMPL, R., DZIADEK, M., FUJIWARA, S., NOWACK, H. & WICK, G. 1983. Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem*, 137, 455--465.
- TOMAKIDI, P., FUSENIG, N. E., KOHL, A. & KOMPOSCH, G. 1997. Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells. *J Periodontal Res*, 32, 388--400.
- TSAI, C. Y., UEDA, M., HATA, K., HORIE, K., HIBINO, Y., SUGIMURA, Y., TORIYAMA, K. & TORII, S. 1997. Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the oral and maxillofacial region. *J Craniomaxillofac Surg*, 25, 4--8.
- TSUKITA, S. & FURUSE, M. 1999. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol*, 9, 268--273.
- WAGENER, C. & MÜLLER, O. 2009. Molekulare Onkologie. *Georg Thieme Verlag KG*, 3. Auflage, 283-286.
- WATT, F. M. 1998. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353, 831--837.
- WEIR, M. D. & XU, H. H. K. 2010. Osteoblastic induction on calcium phosphate cement-chitosan constructs for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*.
- WELSCH, U. 2006. Sobotta, Lehrbuch Histologie. *Elsevier GmbH, Urban & Fischer*, 553-555.
- WOODLEY, D. T., PETERSON, H. D., HERZOG, S. R., STRICKLIN, G. P., BURGESSON, R. E., BRIGGAMAN, R. A., CRONCE, D. J. & O'KEEFE, E. J. 1988a. Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils. *JAMA*, 259, 2566--2571.
- WOODLEY, D. T., STANLEY, J. R., REESE, M. J. & O'KEEFE, E. J. 1988b. Human dermal fibroblasts synthesize laminin. *J Invest Dermatol*, 90, 679--683.

- XIONG, X., ZHAO, Y., ZHANG, W., XIE, W. & HE, S. 2008. In vitro engineering of a palatal mucosa equivalent with acellular porcine dermal matrix. *J Biomed Mater Res A*, 86, 544--551.
- YANG, J., WOO, S. L., YANG, G., WANG, J., CUI, L., LIU, W. & CAO, Y. 2010. Construction and clinical application of a human tissue-engineered epidermal membrane. *Plast Reconstr Surg*, 125, 901--909.
- ZEIN, I., HUTMACHER, D. W., TAN, K. C. & TEOH, S. H. 2002. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23, 1169--1185.
- ZHANG, Y., KROPP, B. P., MOORE, P., COWAN, R., FURNESS, P. D., KOLLIGIAN, M. E., FREY, P. & CHENG, E. Y. 2000. Coculture of bladder urothelial and smooth muscle cells on small intestinal submucosa: potential applications for tissue engineering technology. *J Urol*, 164, 928-34; discussion 934-5.

IX. Anhang

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsbereiche der Mundschleimhaut	S. 11
Abbildung 2: Die drei Schichten der Mundschleimhaut: Epithel, Lamina propria und Submukosa	S. 12
Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer nicht verhornten oralen Epidermis	S. 15
Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer verhornten oralen Epidermis	S. 15
Abbildung 5: Organisation epidermaler Stammzellen, transient amplifizierender Zellen und postmitotischen Zellen im Stratum germinativum.....	S. 17
Abbildung 6: Muster der Stammzell-Verteilung in oralen Epithelien.	S. 17
Abbildung 7: Expression von Genprodukten während der Differenzierung in verhornten und nicht verhornten Epithelien	S. 18
Abbildung 8: Epitheliale Kontaktstellen	S. 20
Abbildung 9: Hauptbestandteile der Basalmembran.....	S. 22
Abbildung 10: IL-1 abhängige dermal-epidermale Interaktionen	S. 27
Abbildung 11: Interdisziplinarität des Tissue Engineering.....	S. 29
Abbildung 12: Prinzip des Tissue Engineering.....	S. 30
Abbildung 13: Trianguläres Konzept des Tissue Engineering	S. 31
Abbildung 14: Modell eines Dermal-Äquivalentes und eines Oralmukosa-Äquivalentes.....	S. 37
Abbildung 15: 50 bp DNA-Leiter	S. 50
Abbildung 16: 100 bp DNA-Leiter Plus	S. 50
Abbildung 17: Aussaat von Fibroblasten auf Scaffolds I.....	S. 60
Abbildung 18: Kultur von Fibroblasten auf Scaffolds II	S. 61
Abbildung 19: Kultur von Fibroblasten und Keratinozyten auf Scaffolds am „Air Liquid Interface“	S. 62
Abbildung 20: Indirekte Immunfluoreszenz	S. 65
Abbildung 21: Reaktionsansatz einer RT-qPCR	S. 78
Abbildung 22: SYBR®GREEN I interkaliert in dsDNA und emittiert Licht.....	S. 78
Abbildung 23: Die DNA-Polymerase synthetisiert DNA, es interkaliert mehr SYBR®GREEN I und die Fluoreszenz steigt	S. 78
Abbildung 24: Schmelzkurvenanalyse: Unspezifische Produkte wie Primerdimere schmelzen deutlich früher als das erwünschte PCR-Produkt	S. 78
Abbildung 25: Phasenkontrastaufnahme von primären Fibroblasten und Keratinozyten beim Auswachsen aus dem Explantat	S. 82
Abbildung 26: Keratinozyten beim Auswachsen aus dem Explantat; Fluoreszenzfärbung von Ki67 (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt	S. 83
Abbildung 27: Wachstumskurven von Fibroblasten in DMEM und DMEM/F12 Medium nach Zellzählung an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach Aussaat (n = 3).....	S. 84
Abbildung 28: Wachstumskurven von Fibroblasten in DMEM und DMEM/F12 Medium nach WST-1 Messung an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach Aussaat (n = 4 - 5).....	S. 85
Abbildung 29: Keratinozyten in DMEM/F12, DMEM und KGM für 2 und 7 Tage.....	S. 86
Abbildung 30: Keratinozyten in KGM auf unbeschichteten Kulturschalen und Kollagen I-beschichteten Kulturschalen nach 1d bzw. 7d Kulturzeit.....	S. 87
Abbildung 31: Konfluente Keratinozyten in KGM und GM	S. 89

Abbildung 32: Expressionslevel des Differenzierungsmarkers K13 relativ zum Referenzgen β -Actin in Keratinozyten, die in GM oder KGM gewachsen waren (n = 4).....	S. 90
Abbildung 33: Wachstum von 5E4 Keratinozyten pro 6-Well in den Differenzierungsmedien KGM + 1,8 mM CaCl_2 , GM, GM + Humanalbumin und GM ohne FCS nach 5 Tagen	S. 91
Abbildung 34: Wachstumskurven von 5E4 Keratinozyten pro 6-Well in unterschiedlichen Medien nach Messung an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 nach Aussaat (n = 4).....	S. 92
Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung von Fibroblasten gegen Vimentin und CD 90; Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt	S. 93
Abbildung 36: Kumulative Darstellung der PDLs (CPDLs) von Fibroblasten im Verlauf der Zeit (n = 5)	S. 94
Abbildung 37: Immunhistochemische Färbung von Keratinozyten gegen Keratin 14 und Keratin 5; Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.....	S. 95
Abbildung 38: Kumulative Darstellung der PDLs (CPDLs) von Keratinozyten im Verlauf der Zeit (n = 6)	S. 96
Abbildung 39: Keratinozyten in der Passage 1 und Passage 5	S. 97
Abbildung 40: Ergebnisse des Zellzählers CASY (Schärfe System) für Zellen der Passage 1 und Zellen der Passage 5	S. 98
Abbildung 41: Vergleich der CPDLs von Keratinozyten und Fibroblasten im Verlauf der Zeit	S. 99
Abbildung 42: Mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEC) nach 3-tägiger Kulturzeit	S. 100
Abbildung 43: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Oberfläche von TFE, DRT und Vicryl	S. 102
Abbildung 44: Kryoschnitte der Membranen TFE, DRT und Vicryl	S. 103
Abbildung 45: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Oberfläche von TFE, DRT und Vicryl nach Besiedelung mit $1\text{E}5/\text{cm}^2$ Fibroblasten nach 4 und 7 Tagen Kulturzeit	S. 105
Abbildung 46: 7-tägige Kultivierung von $2\text{E}5$ Fibroblasts/ cm^2 auf TFE, DRT und Vicryl. Immunhistochemische Färbung von Vimentin (grün), Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)	S. 106
Abbildung 47: OMÄs nach Submerskultur auf TFE, DRT und Vicryl. $5\text{E}5$ Keratinozyten/ cm^2 wurden für 7 Tage und 14 Tag auf DÄs kultiviert. IIF von CD 90, rot (Fibroblasten) und Keratin 14, grün (Keratinozyten). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau).....	S. 109
Abbildung 48: Vergleich der Anzahl an Keratinozytenschichten auf TFE und DRT nach F 14 + K 7 Tagen und F 21 + K 14 Tagen Kulturzeit.....	S. 112
Abbildung 49: Dicke der Keratinozytenschichten auf TFE und DRT nach F 14 + K 7 Tagen und F 21 + K 14 Tagen Kulturzeit in μm	S. 112
Abbildung 50: Vergleich Migration von Fibroblasten in TFE und DRT nach F 14 + K 7 Tagen und F 14 + K 21 Tagen Kulturzeit in μm	S. 112
Abbildung 51: OMÄs nach Submerskultur auf TFE für 14 + 7 Tage und 21 + 14 Tage im Vergleich mit einer Mundschleimhautprobe (Kontrolle). IIF von Kollagen-IV (rot) in der Basalmembranzzone. Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)	S. 113
Abbildung 52: RNA-Mengen, die aus submers auf TFE und DRT kultivierten Mundschleimhautkonstrukten isoliert werden konnten (n = 5).....	S. 114
Abbildung 53: RNA-Gel von 3 verschiedenen Proben, auf dem 2 Banden sichtbar sind, die die 28S und 18S rRNA darstellen.....	S. 115
Abbildung 54: Expressionsanalyse von Kol IV in TFE und DRT-Konstrukten durch semiquantitative PCR im Vergleich zum Referenzgen β -Actin	S. 116

Abbildung 55: Semiquantitative Bestimmung der Kol IV-Expression der Zellen auf TFE nach densitometrischer Auswertung der PCR-Banden mit ImageJ	S. 117
Abbildung 56: Semiquantitative Bestimmung der Kol IV-Expression der Zellen auf DRT nach densitometrischer Auswertung der PCR-Banden mit ImageJ	S. 117
Abbildung 57: Relative Quantifizierung der Kol IV-Expression der Zellen auf TFE und DRT im direkten Vergleich (n = 5).....	S. 118
Abbildung 58: Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Kol IV-Expression von F 21 d + K 14-tägigen Kokulturen im Vergleich zur Summe von 21-tägigen Fibroblasten-Kulturen und 14-tägigen Keratinozyten-Kulturen auf DRT	S. 119
Abbildung 59: Relative Quantifizierung Laminin 1-Expression der Zellen auf TFE und DRT im direkten Vergleich (n = 5).....	S. 120
Abbildung 60: Relative Quantifizierung Laminin 5-Expression der Zellen auf TFE und DRT im direkten Vergleich (n = 5).....	S. 120
Abbildung 61: Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Laminin 5-Expression von F 21 d + K 14-tägigen Kokulturen im Vergleich zur Summe von 21-tägigen Fibroblasten-Kulturen und 14-tägigen Keratinozyten-Kulturen auf DRT	S. 121
Abbildung 62: Relative Quantifizierung der Keratin 14-Expression von Zellen auf TFE (blau) und DRT (rot) im direkten Vergleich (n = 5)	S. 122
Abbildung 63: Relative Quantifizierung der Keratin 13-Expression von Zellen auf TFE (blau) und DRT (rot) im direkten Vergleich (n = 5)	S. 122
Abbildung 64: Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Keratin 13-Expression der F 14 + K 7-tägigen Kokulturen im Vergleich zu den F 21 + K 14-tägigen Kokulturen auf TFE	S. 122
Abbildung 65: Boxplot-Darstellung der relativ quantifizierten Keratin 13-Expression der F 14 + K 7-tägigen Kokulturen im Vergleich zu den F 21 + K 14-tägigen Kokulturen auf DRT	S. 122
Abbildung 66: OMÄ nach Kultur im ALI auf DRT in 100-facher Vergrößerung nach einer Kulturzeit von F 21 + K 14 Tagen im Vergleich zu normaler Mundschleimhaut. IIF von CD 90, rot (Fibroblasten) und Keratin 14, grün (Keratinozyten). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau).....	S. 124
Abbildung 67: Dicke der Epithelschicht (µm) auf DRT nach 21 + 14 Tagen Kulturzeit in Submerskultur im Vergleich zur Kultur im Air Liquid Interface (n = 3 - 4)	S. 125
Abbildung 68: OMÄ nach Kultur im ALI auf DRT in 200-facher Vergrößerung nach einer Kulturzeit von F 21 + K 14; IIF von Kol IV, rot; IIF von Ki67, rot; Färbung der Zellkerne mit DAPI, blau.....	S. 126
Abbildung 69: RNA-Mengen, die aus Submers- und Air-Liquid-Interface-Kulturen nach F 21 + K 14-tägiger Kultur isoliert werden konnten in µg/µl (n = 6 - 8)	S. 127
Abbildung 70: Relative Quantifizierung der Kollagen IV-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur.....	S. 128
Abbildung 71: Relative Quantifizierung der Laminin 5-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur.....	S. 128
Abbildung 72: Relative Quantifizierung der Keratin 14-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur.....	S. 128
Abbildung 73: Relative Quantifizierung der Keratin 13-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur.....	S. 128

Abbildung 74: Relative Quantifizierung der Laminin 1-Expression von OMÄs auf DRT nach F 21 + K 14-tägiger Submers- und Air Liquid Interface-Kultur.....	S. 128
Abbildung 75: Azellularisierte SIS-Membran zur Besiedelung mit Zellen	S. 129
Abbildung 76: Aufbau der OMÄs auf SIS nach einer Kulturzeit von F 21 + K 14 Tagen. HE-Färbungen von Kryoschnitten.....	S. 130
Abbildung 77: OMÄs nach Kultur am ALI auf SIS im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut. IIF-Färbung von CD 90, rot (Fibroblasten) und Keratin 14, grün (Keratinocyten). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau).....	S. 131
Abbildung 78: OMÄs nach Kultur am ALI auf SIS im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut. IIF-Färbung von Kollagen IV (rot). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)	S. 132
Abbildung 79: OMÄs nach Kultur am ALI auf SIS im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut. IIF-Färbung von Laminin 5 (rot). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)	S. 133
Abbildung 80: OMÄs nach Kultur im ALI auf SIS im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut. IIF-Färbung von Ki67, rot. Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)	S. 134
Abbildung 81: IIF von normalen Mundschleimhautproben: Keratin 13, Filaggrin; Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau)	S. 135

2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ALI	' <i>Air Liquid Interface</i> ' (Luft-Medium-Grenze)
AP-1	Aktivator-Protein 1
b-FGF	' <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> '
bp	Basenpaar(e)
BPE	' <i>Bovine Pituitary Extract</i> ' (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	bovines Serumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	' <i>complementary DNA</i> ' (komplementäre DNA)
CEA	' <i>Cultured Epidermal Autografts</i> '
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CNT	' <i>Counts</i> '
Cp	' <i>Crossing point</i> '
CPDL	' <i>Cumulative Population Doubling Level</i> '
Cy2, 3	Carbocyanin 2, 3
d	Tag(e)
DÄ	Dermal-Äquivalent
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destiliert
DMEM	' <i>Dulbecco's MEM</i> ' (s. MEM)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphate
DPBS	' <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> ' (Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlosung)
DRT	' <i>Dermal Regeneration Template</i> '
dsDNA	' <i>double-stranded DNA</i> ' (doppelsträngige DNA)
E	PCR-Effizienz
ECGM MV	' <i>Endothelial Cell Growth Medium Microvascular</i> '
ECGS/H	' <i>Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin</i> '
ECM	' <i>extracellular matrix</i> ' (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EGF	' <i>Epidermal Growth Factor</i> ' (epidermaler Wachstumsfaktor)
engl.	auf Englisch
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen
EtOH	Ethanol
EVPOME	' <i>Ex Vivo Produced Oral Mucosa Equivalent</i> '
F	Fibroblasten
FACS	' <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> ' (Durchflusszytometrie)
FCS	fötale Kälberserum
FDA	' <i>Food and Drug Administration</i> '
g	Gramm

GAG	Glykosaminoglykan
GM	'Green's Medium'
GM-CSF	'Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor'
h	Stunde
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
i. d. R.	in der Regel
IgA	Immunglobulin des Isotyps A
IHC	Immunhistochemie
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL-1	Interleukin 1
K	Keratinocyten
K1, 4, 5, 10, 13, 14	Keratin 1, 4, 5, 10, 13, 14
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KGF	'Keratinocyte Growth Factor' (Keratinocyten-Wachstumsfaktor)
KGM	'Keratinocyte Growth Medium'
Kol IV	Kollagen IV
kV	Kilovolt
l	Liter
Lam 1, 5	Laminin 1, 5
M	molar
MDB	'Membrane Desalting Buffer'
MEM	'minimal essential medium' (minimalessentielles Medium)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MLV RT	'Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase'
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	'messenger RNA' (Boten-RNA)
mvEC	mikrovaskuläre Endothelzellen
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
N	Normalität
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte (Extinktion)
OMÄ	Oralmukosa-Äquivalent
p	p-Wert (Signifikanzniveau)
PB	'phosphate-buffer' (Phosphatpuffer)
PBS	'phosphate-buffered saline' (Phosphat-gepufferte Kochsalzlosung)
PCL	Poly ϵ -Caprolacton
PCR	'Polymerase Chain Reaction' (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF-BB	'Platelet Derived Growth Factor BB'
PDL	'Population Doubling Level'
Pen/Strep	Penicillin-/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglykolsäure

pH	<i>'potentia Hydrogenii'</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- bzw. Oxoniumkonzentration)
PLA	Polylaktid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PLLA	Poly-L-Laktidsäure
PPAR γ	<i>'Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ'</i>
PTN	Pleiotrophin
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>'rotations per minute'</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	<i>'Real-Time-quantitative-PCR'</i>
s	Sekunde
S.	Seite
SDF-1	<i>'Cell-Derived Factor-1'</i>
SIS	<i>'Small Intestinal Submucosa'</i>
sog.	sogenannt
ssDNA	<i>'single-stranded DNA'</i> (einzelsträngige DNA)
Tab.	Tabelle
TFE	TissuFoilE
TGF- α , β	<i>'Transforming Growth Factor α, β'</i> (Transformierender Wachstumsfaktor- α , β)
T _m	Schmelztemperatur
TNM-Klassifikation	<i>'Tumour-Node-Metastasis'</i> -Klassifikation
Tris-HCl.	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH mit HCl eingestellt
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>'Vascular Endothelial Growth Factor'</i>
WST	<i>'Water Soluble Tetrazolium'</i>
z. B.	zum Beispiel

3. Publikationen und Tagungsbeiträge

3.1 Publikationen

- **Kriegebaum, U.**, Mueller-Richter, U. D. A., Klammert, U., Kuebler, A. C., Reuther, T. (2011). Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds *-in vitro* experiments as a basis for clinical applications. Clinical Oral Investigations (eingereicht).
- **Kriegebaum, U.**, Mueller-Richter, U. D. A., Klammert, U., Kuebler, A. C., Reuther, T. (2010). Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds for clinical applications. Selected papers from the XX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Bruges, 14.-17.09.2010, (Medimond International Proceedings) 365-370.
- Müller-Richter, U.D.A., Krauss, E., Rauthe, S., Böhm, H., **Kriegebaum, U.**, Klammert, U., Gattenlöher S., Kochel M., Kübler, A. C., Reuther, T. (2010). Differentiation between benign and malign transformed precancerous lesions of the oral mucosa with MAGE-A-antigens. Selected papers from the XX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Bruges, 14.-17.09.2010, (Medimond International Proceedings) 63-68.
- Krauss, E., Rauthe, S., Gattenlohner, S., Reuther, T., Kochel, M., **Kriegebaum, U.**, Kübler, A. C., and Müller-Richter, U. D. (2010). MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa. Clin Oral Investig. [Epub ahead of print]
- **Kriegebaum, U.**, Klammert, U., Mueller-Richter, U., Kübler, A., Reuther, T. (2009). Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds for clinical applications. Human Gene Therapy 20: 1538.

3.2 Tagungsbeiträge

- XX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery (EACMFS)
Brügge (Belgien), 14.-17.09.2010
Vortrag: "Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds for clinical applications"
Ulrike Kriegebaum, Tobias Reuther
- 60. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie / 31. Jahrestagung des Arbeitskreises für Oralpathologie und Oralmedizin
Bad Homburg, 13.-14.05.2010
Poster: „Tissue Engineering eines gewebeähnlichen Konstruktes auf verschiedenen Trägern zum Ersatz der Oral Mukosa“
Tobias Reuther, Ulrike Kriegebaum, Uwe Klammert, Urs Müller-Richter, Michael Kocheil, Isabell Reuther, Alexander C. Kübler
- Combined Meeting: XVIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT); 4th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research (GSZ); 16th Annual Meeting of the German Society of Gene Therapy (DGGT) Co-organized by the European Branch of the International Society for Cellular Therapy (ISCT); Hannover, 20.-15.11.2009
Poster: "Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds for clinical applications"
Ulrike Kriegebaum, Uwe Klammert, Urs Müller-Richter, Alexander Kübler, Tobias Reuther