

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler**

**Steigerung der Proliferationsfähigkeit primärer humaner
Keratinocyten aus oraler Mukosa im Zellkultursystem durch
Anreicherung von humanen epidermalen Stammzellen**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

Janike Dickhuth

aus Freiburg im Breisgau

Würzburg, Juni 2013



Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Tobias Reuther

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2014

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktion der Haut.....	1
1.1.1	Epidermis.....	2
1.1.2	Dermis	3
1.1.3	Subkutis	5
1.1.4	Unterschiede zwischen Mundschleimhaut und Haut.....	5
1.2	Epidermale Stammzellen der Schleimhaut	7
1.3	Differenzierung der Keratinozyten.....	9
1.3.1	Orthokeratinisation	9
1.3.2	Nicht-keratinisiertes Epithel	10
1.3.3	Parakeratinisation.....	11
1.4	Basallamina	11
1.5	Tissue Engineering.....	14
2	Zielsetzung der Arbeit	15
3	Material.....	16
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	16
3.2	Medien	17
3.3	Medienzusätze	20
3.4	Puffer, Lösungen und Enzyme.....	21
3.5	Patienten und Untersuchungsmaterial	22
4	Methoden	23
4.1	Gewinnung und Isolation der Zellen	23
4.1.1	Gewinnung humaner oraler Keratinozyten	23
4.1.2	Explantation und Isolation oraler Keratinozyten	24

4.1.3 Separationsmethode zur Verhinderung der Kontamination mit Fibroblasten.....	24
4.2 Kultivierung der Zellen	25
4.2.1 Zellkultur, Passagierung, Zellzählung.....	25
4.3 Anreicherung epidermaler Stammzellen	26
4.3.1 - Adhäsion an unbeschichteten Platten.....	27
4.3.2 - Adhäsion an Kollagen-IV-beschichteten Platten	27
4.3.3 - Adhäsion an Laminin-beschichteten Platten	27
4.3.4 Versuchsanordnung für Real-Time-Zellanalyse	28
4.4 Langzeitlagerung	28
4.4.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	28
4.5 Methoden zur Quantifizierung der Zellproliferation und Zellvitalität.....	30
4.5.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Zellzählgerät.....	30
4.5.2 Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1-Test	31
4.5.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Impedanzmessung	32
4.6 Statistische Auswertung.....	34
5 Ergebnisse	35
5.1 Explantation und Isolation humaner oraler Keratinozyten	35
5.2 Verhinderung der Kontamination mit Fibroblasten	36
5.3 Anreicherung epidermaler Stammzellen	38
5.3.1 Wachstumskurve	38
5.3.2 WST-1-Test	40
5.3.3 Real-Time-Zellanalyse.....	43
6 Diskussion	47
6.1 Explantation und Isolation humaner oraler Keratinozyten	48
6.2 Verhinderung der Kontamination mit Fibroblasten	49
6.3 Anreicherung epidermaler Stammzellen	50
- Beurteilung der Zellproliferation und Zellaktivität	52

6.3.1 Wachstumskurve	52
6.3.2 WST-1-Test	53
6.3.3 Real-Time-Zellanalyse	54
7 Zusammenfassung	56
8 Literatur	58
9 Anhang	64
9.1 Abbildungen	64
9.2 Abbildungsverzeichnis.....	65
9.3 Abkürzungsverzeichnis.....	67
Danksagung.....	
Lebenslauf.....	

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut als das größte Organ des Menschen mit einer Fläche von 1,6 – 2,0 m² und einer Dicke von 1,5 – 4 mm (je nach Belastung) überzieht und schützt die Außenseite des Organismus [1]. Trotz ihres Gewichtes von bis zu 12 Kilogramm wird sie nicht als eines der wichtigsten Organe wahrgenommen [2]. Die bedeutendste Funktion der Haut stellt der Schutz vor äußeren Einflüssen dar. Sie wirkt mit ihrer Zugfestigkeit, Dehnbarkeit und Elastizität sowohl gegen mechanische Einwirkungen als auch mit ihrem Säureschutzmantel (pH 5,7), der eine enorme Pufferkapazität besitzt [3], gegen chemische Noxen. Zu den weiteren Mechanismen zählen ihre Barrierefunktion und Abwehr gegen Mikroorganismen sowie der Schutz vor UV-Licht und Austrocknung. Hier schließt sich die Temperaturregulation des Körpers durch Schweißbildung, Diffusion von Wasser durch die Hautoberfläche und die Isolierung durch das Fettgewebe als Austauschfunktion der Haut an. Aber auch zur Reizaufnahme durch Mechanorezeptoren, Thermorezeptoren und Nozizeptoren ist die Haut fähig. Diese unterschiedlichsten Funktionen werden durch den geschichteten Aufbau der Haut gewährleistet.

Sie gliedert sich von außen nach innen in folgende 3 Schichten: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Korium, Lederhaut), Subkutis (Unterhautfettgewebe) (Abbildung 1).

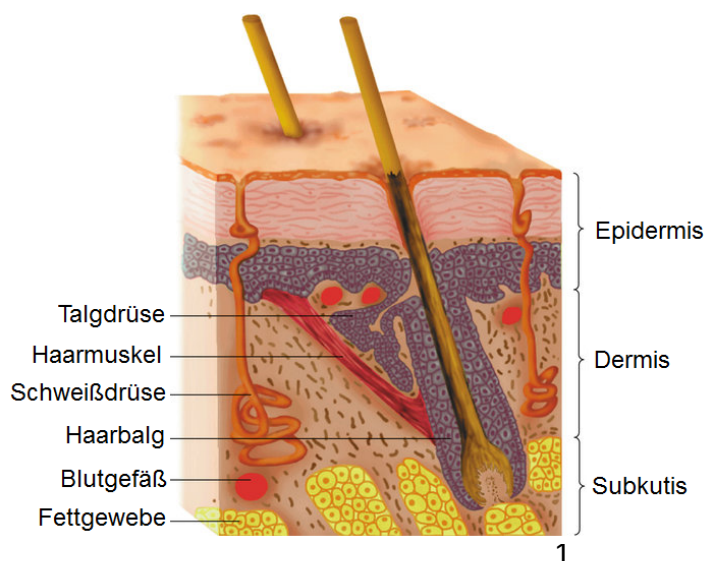


Abbildung 1:
Aufbau der Haut, modifiziert
nach Bibliographisches Institut
GmbH, Mannheim [4]

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis bildet eine undurchlässige Hornschicht als Grenzzone zur Umwelt, die einer ständigen Erneuerung unterliegt. Das mehrschichtige verhornende Plattenepithel enthält keine Blut- oder Lymphgefäße (die Ernährung erfolgt aus der darunter liegenden Dermis) und besteht zum größten Teil aus Keratinozyten, die aus Stammzellen im Stratum basale gebildet werden und bis an die Oberfläche wandern. Die sich verändernde Form und Funktion der Keratinozyten lässt folgende Schichtenbildung der Epidermis von basal nach apikal (= äußere Hautschicht) erkennen (siehe auch Abbildung 2):

Das Stratum basale besteht aus einer einschichtigen Lage kubischer Zellen, wobei sich die Vorläuferzellen der Keratinozyten durch einen großen Zellkern und wenig Zytoplasma auszeichnen. Diese Stammzellen steuern durch mitotische Teilung die Bildung neuer Keratinozyten. Diese Zellschicht liegt der Basallamina auf [5], welche Epithel und Bindegewebe trennt. Im Stratum basale folgenden Stratum spinosum fängt die Differenzierung der Keratinozyten an. Die Zellen zeichnen sich durch „stachelartige“ Zytoplasma-Ausläufer aus, die als interzelluläre Brücken fungieren, indem sie desmosomale Zellkontakte zu anderen Zellen herstellen. Weiterhin beginnt in dieser Schicht bereits durch verstärkte Produktion von Keratin die Verhornung. Die stachelartigen Keratinozyten entwickeln sich zu abgeflachten und mit keratohyalinhaltigen Granula gefüllten Körnerzellen, die das folgende Stratum granulosum formen. Die Bildung des Keratohyalins dient als Schutz vor Wasserverdunstung und vor eindringenden Externa als Barriere. Die durch Apoptose, d.h. durch den programmierten Zelltod entstandenen flachen, kernlosen Hornzellen des Stratum corneum bilden die äußerste Schicht der Haut und schützen gegen chemische und mechanische Einwirkungen. Die Zeit von der Entstehung eines Keratinoblasten bis zu seiner terminalen epidermalen Differenzierung beträgt bei der extraoralen Haut etwa 4 Wochen [6].

Weitere Zelltypen der Epidermis sind die Melanozyten im Stratum basale. Sie besitzen langgestreckte Dendriten, die sich weit zwischen benachbarte Epithelzellen vorschieben und melaninhaltige Granula, die Melanosomen, durch Phagozytose an die Keratinozyten abgeben können; dieser Prozess dient dem Schutz vor UV-Strahlung. Die Langerhans-Zellen des Stratum spinosum zeichnen sich ebenfalls durch dendritische Ausläufer aus. Sie enthalten typische Birbeck-Granula (tennisschlägerartig geformte Granula) [7] und spielen im Rahmen von Immunreaktionen durch Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Helfer-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Als Mechanorezeptoren dienen Merkel-Zellen. Sie sind zwischen den Basalzellen anzutreffen, wo sie über die Ausschüttung neurosekretorischer Vesikel an synaptischen Kontakten zu Nervenendigungen die Tast- und Druckperzeption steuern. Außerdem kommen vereinzelt Lymphozyten in der gesamten Epidermis vor.

Die als dermo-epidermale Junktionszone [8] bezeichnete Grenzfläche verzahnt die beiden Hautschichten durch epidermale Reteleisten und dermale Papillen miteinander. Die dazwischen liegende Basalmembran besteht aus zwei Schichten: Aus der Basallamina, die sich lichtmikroskopisch noch weiter in die mit der Epidermis über Hemidesmosomen und Ankerfilamente verbundenen Lamina lucida und die mit der Dermis über Ankerfibrillen verbundene Lamina densa definieren lässt, sowie aus der Lamina fibroreticularis, welche die Basallamina (und damit die zugehörigen Zellen) mit dem umgebenden Stroma verknüpft. Zu ihren vielfältigen Aufgaben gehört u.a. die Kontrolle des Austauschs von Molekülen zwischen Zellen verschiedener Gewebe, sodass sie auch bei Wundheilungsprozessen, der Tumorinvasion und -metastasierung eine Rolle spielt [9].

1.1.2 Dermis

Das auch als Lederhaut bezeichnete Korium ist das spezifische Bindegewebe der Dermis. Es bildet das Gerüst der Haut und bestimmt deren Elastizität und Reißfestigkeit. Zu den Hauptkomponenten zählen Bindegewebsfasern und Fibroblasten, die in einer gelartigen Grundsubstanz aus Proteoglykanen eingebettet

sind. Außerdem verlaufen in der Dermis die hautversorgenden Gefäße und Nerven. Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten, dem Stratum papillare und den darunterliegenden Stratum reticulare. Die Bindegewebszapfen des schmalen Stratum papillare ragen in die Vertiefungen der Epidermis hinein und verbinden sich mit der Lamina densa der Basalmembran. Das Stratum papillare besteht überwiegend aus Fibroblasten, welche kollagene Fasern und amorphe extrazelluläre Matrix synthetisieren und übernimmt durch seinen Gefäßreichtum auch nutritive Funktionen. Das darunterliegende breite Stratum reticulare hingegen enthält kräftige Kollagenfaserbündel und elastische Fasernetze und ist damit hauptsächlich für die mechanischen Funktionen wie Stabilität, Dehnbarkeit und Reißfestigkeit der Haut verantwortlich. Hier befinden sich auch weitere Mechanorezeptoren (Vater-Pacini-Körperchen) und Dehnungsrezeptoren (Ruffini-Körperchen) [10], sowie Haarfollikel und verschiedene Hautdrüsen. Ein weiterer Zelltyp sind die Histiozyten, deren Vorläufer, die Monozyten, vom Knochenmark über die Blutbahn einwandern um sich in der Dermis zu differenzieren. Sie phagozytieren Mikroben und körperfremde Strukturen, aktivieren eine Immunreaktion durch Präsentieren von Antigenen und produzieren Interferon. Außerdem beseitigen sie auch anfallende Abbaustoffe wie Melanin, Proteine und Fette. Die in der gesamten Dermis verstreuten Mastzellen beteiligen sich an allergischen und entzündlichen Prozessen. Ihre charakteristischen Granula enthalten unter anderem Heparin, Serotonin und Histamin [11]. Neben der metabolischen Versorgung von Dermis und Epidermis dient der tiefe, dermale Blutgefäßplexus an der Grenze zur Subkutis und der oberflächliche, subpapilläre Plexus der Temperatur- und Blutdruckregulation des Körpers. Schnelle Druckrezeptoren (Meissner-Tastkörperchen) finden sich im Stratum papillare unbehaarter Dermis [12]. Hautanhänge wie Haare oder Schweiß- und Talgdrüsen, die sich in manchen Hautarealen finden, haben ihren Ursprung in den tieferen Schichten der Dermis.

1.1.3 Subkutis

Die Tela subcutanea oder Subkutis besteht aus weißem Fettgewebe, welches von lockeren, lamellär angeordneten Bindegewebssepten durchzogen wird. Es dient der Wärmeisolation, als mechanischer Schutz, zur Verschieblichkeit der Haut und als Energiespeicher. Außerdem finden sich hier die Sinneszellen für epikritische Reize (Tastschärfe), wie zum Beispiel die Lamellenkörperchen.

1.1.4 Unterschiede zwischen Mundschleimhaut und Haut

Da die vielfältigen Aufgaben der Haut mit denen der Mundschleimhaut in vielen Punkten identisch sind, gleicht sich ihr Aufbau und unterscheidet sich nur in einigen wenigen histologischen Merkmalen [13]. Die Mundschleimhaut lässt sich ebenfalls von außen nach innen in drei Teile gliedern: Die Mukosa als mehrschichtiges Plattenepithel liegt über einem bindegewebigen Stroma, der Lamina propria. Die Grundlage bildet, außer im Bereich der Gingiva und des harten Gaumens, eine unterschiedlich ausgeprägte Submukosa.

Je nach Region und mechanischer Beanspruchung liegt die Oralmukosa in verhornter (keratinisierter) oder unverhornter (nicht-keratinisierter) Form vor. Während die Schichten der keratinisierten Form denen der bereits beschriebenen äußeren Haut entsprechen (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum corneum), wird im Aufbau der nicht-keratinisierten Mundschleimhaut das Stratum granulosum durch eine Zwischenschicht (Stratum intermedium) ersetzt, deren Zellen keine keratohyalinhaltigen Granula besitzen [14]. Es folgt als oberflächlichste Schicht das Stratum superficiale [15] (Abbildung 2).

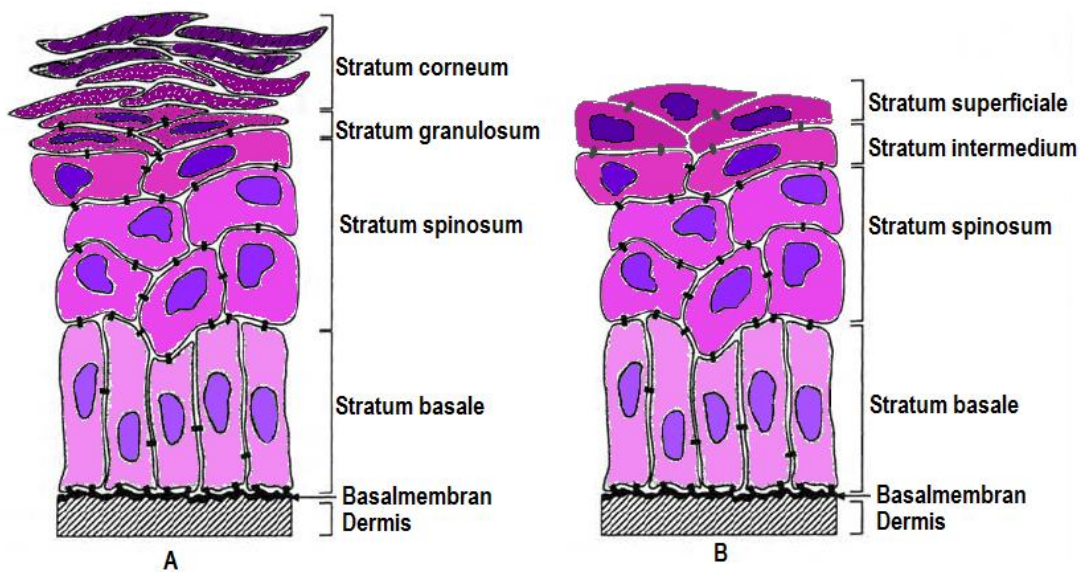


Abbildung 2:
Schematischer Aufbau der verhornten (A) und nicht-verhornten (B) oralen Epidermis.
Abbildung verändert nach Presland and Dale [16].

Somit finden sich im oberen Teil des Integuments der Mundschleimhaut, je nach funktionaler Notwendigkeit, deutliche Unterschiede im Gewebsaufbau, aufgrund dessen eine weitere Einteilung [17] möglich ist:

1. Die „mastikatorische“ Schleimhaut im Bereich der „freien“ und befestigten Gingiva und des vorderen harten Gaumens. Sie ist aufgrund ihrer hohen und eng beieinander stehenden Bindegewebspapillen fest haftend und nicht verschieblich. Den mechanischen Ansprüchen wird sie durch ihr verhorntes Epithel (ortho- oder parakeratinisiert) besonders gut gerecht.
2. Die leicht verschiebliche „auskleidende“ Schleimhaut (lining mucosa), welche sich im Gebiet des weichen Gaumens, des hinteren harten Gaumens, des Uvulabereichs, der Zungenunterseite, der Wangen, der Lippen und des Mundbodens ausbreitet. Sie ist elastischer und flexibler als die „mastikatorische“ Schleimhaut [18] und besitzt ein nicht verhorntes Epithel. Zusätzlich zu dem lockeren Bindegewebe aus elastischen Fasern und den Blutgefäßen der Lamina propria ist hier meist eine Submukosa mit Drüsen vorhanden.

3. Die „spezialisierte“ Mukosa des Zungenrückens, die mit ihren verschiedenen Papillen und Geschmacksknospen für die gustatorische Sinneswahrnehmung zuständig ist. Im vorderen Bereich der Zunge ist sie orthokeratinisiert [19], im hinteren Abschnitt nicht. Hier zeigen sich jedoch Krypten, die von lymphepithelialelem Gewebe umgeben sind.

In der Mundschleimhaut finden sich keine Haarfollikel oder Schweißdrüsen und die Selbsterneuerung der oralen Schleimhaut durch Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten erfolgt aufgrund der hohen täglichen Beanspruchung innerhalb von 12 bis 13 Tagen [20]. Sie benötigt damit weniger als die Hälfte der Zeit zur Regeneration als die extraorale Haut.

1.2 Epidermale Stammzellen der Schleimhaut

Die epidermalen Stammzellen der Schleimhaut bilden die Grundlage für die Regeneration, Differenzierung und Homöostase des Gewebes [21]. Sie liegen meist in Clustern angeordnet auf der Basallamina und besitzen ein hohes Proliferationspotenzial. In dieser auch als Stratum germinativum bezeichneten Keimschicht befinden sich noch zwei weitere Zell-Subpopulationen. Durch ihre Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung reproduziert die Stammzelle sich selbst und bildet *transiente* Vorläuferzellen als direkte Nachkommen [15]. Diese besitzen zwar eine hohe Teilungsrate, ihr begrenztes Proliferationspotenzial erschöpft sich allerdings nach zwei bis fünf durchlaufenen Zellzyklen [22, 23]. Aus ihnen gehen postmitotische Zellen hervor, deren Weg in der endgültigen Differenzierung endet [24]. Diese drei beschriebenen Zellarten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression der β 1-Untereinheit des Adhäsionsproteins Integrin. Die höchste Expression zeigen die Stammzellen, gefolgt von den transient amplifizierenden Zellen und den postmitotischen Nachkommen [25]. Ein gehäuftes Vorkommen dieser transmembranen Proteine scheint also für den Erhalt der Stammzeleigenschaften notwendig zu sein und schützt die Zelle vor Differenzierung [26]. Mit anderen Worten, je weniger eine Zelle diesen Rezeptor für extrazelluläre Matrixproteine ausbildet, desto

wahrscheinlicher ist sie am Übergang in einen differenzierten Zustand [22]. Die Korrelation zwischen der Affinität zu Komponenten der Basallamina und der Stammzellpotenz eignet sich zur Isolation oraler Keratinozyten mit einem hohen Proliferationspotenzial [27]. Die erhöhte $\beta 1$ -Integrin-Expression kann zudem als Marker zum Lokalisieren der Stammzellen in der humanen Epidermis genutzt werden [28]. Während sich die Stammzell-Cluster der äußeren Haut in der Haarbalgregion, der germinalen Haarfollikelmatrix [22] und den Spitzen der dermalen Papillen [29] der interfollikulären Epidermis befinden und die entstehenden Übergangszellen durch eine Seitwärtsbewegung in die Täler der Papillen geschoben werden (Abb. 3 [24]), zeigt sich die Anhäufung in der Oralmukosa in den Tälern der Reteregion (Abb. 4 [30]). Der Differenzierungsweg erfolgt hier in entgegengesetzter Richtung, somit liegen auf der Basalmembran neben den Stammzellen mit der höchsten Expression von $\beta 1$ -Integrin (A) die transient amplifizierenden Zellen (B) und postmitotische Zellen (C) im suprabasalen Raum.

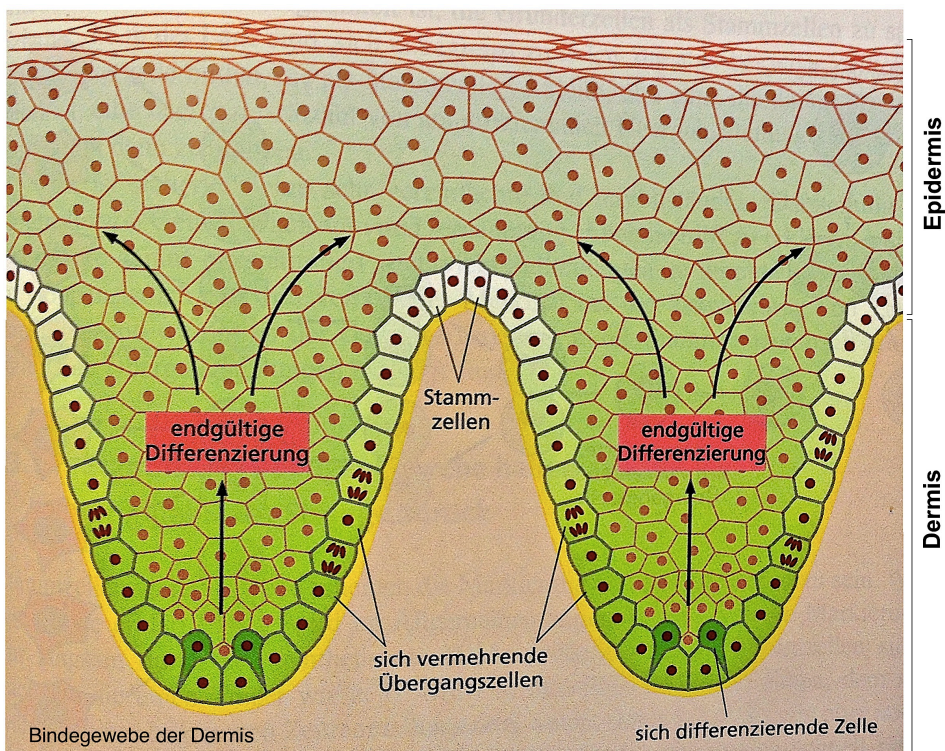


Abbildung 3:
Verteilung der Stammzellen innerhalb der normalen Haut und deren proliferative Ausbreitung [24]

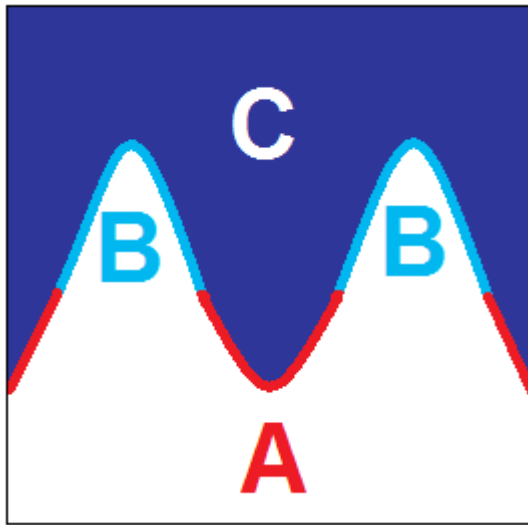


Abbildung 4:

Schema der Stammzell-Verteilung in oralen Epithelien verändert nach Dabelsteen und Mackenzie [30]. Die Stammzellen mit der höchsten Expression von β 1-Integrin (A) liegen neben transient amplifizierende Zellen (B) auf der Basalmembran. Die postmitotischen Zellen (C) befinden sich im suprabasalen Raum.

1.3 Differenzierung der Keratinozyten

Im Gegensatz zu der Epidermis der extraoralen Haut, die orthokeratinisiert ist, kommen in der Mundschleimhaut alle drei Variationen der Keratinisation vor: Orthokeratinisation, Parakeratinisation und nicht-keratinisiertes Epithel [31].

1.3.1 Orthokeratinisation

Wie schon im Aufbau der Epidermis beschrieben unterliegen die Keratinozyten von basal nach apikal einem Differenzierungsprozess (Keratinisierung). Die in der einlagigen Basalzellschicht liegenden, isoprismatischen, epidermalen Stammzellen mit großem Zellkern und wenig Zytoplasma sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verknüpft und somit auch mit der Dermis verbunden. Sie sind mitotisch aktiv und gewährleisten damit die ständige Epithelerneuerung der Haut. Ihre entstandenen Tochterzellen steigen in die höheren Schichten auf und beenden damit die Proliferation und beginnen den Vorgang der Differenzierung [32]. Diese zeigt sich im Stratum spinosum an der stachelartigen Form der Zellen, die durch lange Zytoplasma-Ausläufer zustande kommt. Deren brückenhafte Verbindungen zu anderen

Keratinocyten sind im Schnittpräparat aufgrund artifizieller Schrumpfung besonders deutlich zu erkennen (Namensgebung der Stachelzellschicht) [32] und werden durch Desmosomen sichergestellt. Diese kleinen (0,3 µm) interzellulären Adhäsionskontakte bestehen aus mehreren Einheiten. Zum einen aus Transmembranproteinen (für die Bindung an die Nachbarzelle) sowie den Plaque-Proteinen zur Verankerung des Zytoskeletts an der Innenseite der Zellmembran und den Intermediärfilamenten (aus Zytokeratin), die neben den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli das Zytoskelett bilden. Zudem koppelt der Kommunikationskontakt vom Typ der ‚Nexus/Gap junctions‘ die Zellen zu einer elektrischen und metabolischen Funktionseinheit [32]. Im folgenden Stratum granulosum weisen die Zellen schon eine deutliche polygonale Form auf, die sich als Folge der Dehydratation darstellt. Die zunehmenden Aggregationen von Zytokeratinfilamenten erscheinen im Lichtmikroskop als auffällig sichtbare Keratohyalingranula, welche in der Hornschicht durch weitere Vernetzungen zum mechanisch und chemisch sehr widerstandsfähigen Keratin verschmelzen. Während diese Bausteine zunehmend einen größeren Anteil des Zytoplasmavolumens einnehmen, nimmt die Dichte der Zellorganellen von basal nach superfiziell immer weiter ab. Die flachen Zellen des Stratum corneum besitzen keinen Kern mehr und liegen nah aneinander.

1.3.2 Nicht-keratinisiertes Epithel

Im nicht-verhornten Epithel behalten die apikalen Zellen ihren Kern und das Zytoplasma beinhaltet keine Keratinfilamente [20]. Zudem liegen sie durch interzelluläre Spalten getrennt weit auseinander und sind ungleichmäßig angeordnet [15].

Neben diesen morphologischen Unterschieden gegenüber der keratinisierten Form des Epithels ändert sich je nach Differenzierungsstatus und Zell-Lage die Produktion von Struktur- und Hüllproteinen, sowie das Zytokeratin-Expressionsprofil der Keratinocyten [15, 33]. Die Zytokeratine bilden meist heterodimere Komplexe, wobei immer ein Typ-A (sauer, K9 – K20) und ein Typ-B (neutral-basisch, K1 – K8) Zytokeratin koexprimiert

werden [16]. Zunächst weisen alle Basalzellen der beiden Epithelien die Keratine K5 und K14 auf [34], deren Anzahl sich nach Eintritt in die erste Schicht des Differenzierungsprozesses, der Stachelzellschicht, wieder vermindert [35, 36]. Während in den suprabasalen Zellen des nicht-keratinisierten Epithels K4 und K13 exprimiert werden, zeigen sich bei der keratinisierten Form die Paare K1/K10, sowie K2/K11 [15]. Somit trennt sich hier der Weg der beiden Differenzierungsmodelle und unterstreicht den Unterschied zwischen extraoraler und oraler Haut.

1.3.3 Parakeratinisation

In parakeratinisiertem Epithel enthält das Zytoplasma der oberflächlichen Zellen wenige bis gar keine Keratinfilamente. Die pyknotischen Kerne weisen eine dunkle Färbung auf. Diese mit der Gingiva assoziierte Form der Keratinisation gleicht in ihrem Schichtaufbau der nicht-keratinisierten Mundschleimhaut, da das Stratum granulosum und das Stratum corneum ebenfalls fehlen [20]. Dennoch scheint es gegenüber mechanischer Belastung weniger anfällig zu sein als die nicht-keratinisierte Mundschleimhaut, da es sich eher um eine nicht vollendete Keratinisation handelt.

1.4 Basallamina

Die Basalmembran gilt als Musterbeispiel für Zell-Matrix-Interaktionen [32]. Denn neben der Stützfunktion und Verankerung der Zellen über fokale Kontakte und Hemidesmosomen ist es heute allgemein akzeptiert, dass die Basalmembran an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen beteiligt ist [37]. Sie stellt eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix (ECM) dar [38] und bildet ein Netzwerk aus verschiedenen Proteinen und Proteoglykanen, durch welches das Epithel gegenüber dem bindegewebigen Stroma abgegrenzt wird und dennoch zugleich fest daran verankert ist. Die ultrastrukturelle Analyse der Basalmembran (siehe Kapitel 1.1.1) ergibt eine weitere Aufteilung in die Basallamina und das Geflecht aus retikulären Fasern der Lamina fibroreticularis. Die Komponenten der Basalmembran werden von Fibroblasten und Keratinozyten produziert [39, 40], wobei die Basallamina hauptsächlich von denjenigen Zellen hergestellt wird, die auf ihr sitzen

[32]. Ihre Aufteilung in eine scheinbar leere Zone, Lamina rara (= lucida, 10 – 50 nm) und eine etwa 20 – 120 nm breite Lamina densa kann nur elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Die Hauptbestandteile der Basallamina, Kollagen Typ-IV und Laminin [41], sowie weitere Bausteine sind in Abbildung 5 [32] dargestellt:

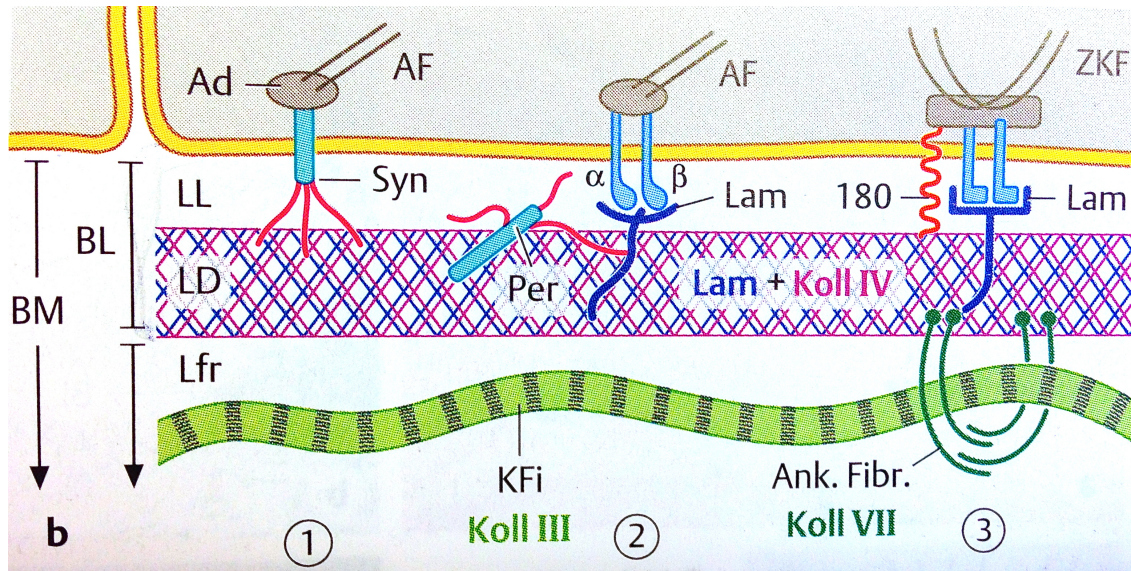


Abbildung 5:

Vereinfachtes Schema über den molekularen Bau der Basalmembran (BM) und Basallamina (BL), (1) und (2), zeigt die Haftung der Zelle an der Lamina densa (LD) durch Syndecan (Syn) oder durch Bindung zwischen Laminin (Lam) und Integrin (α - und β -Untereinheiten). Dieses Prinzip existiert bei allen Epithelien. Mikrofibrillen (MFi) aus Fibrillin und aus Kollagen-IV verankern die Basallamina in der Lamina fibroreticularis (Lfr). (3) Bei Epithelien mit starker Schubbeanspruchung findet sich eine zusätzliche Sicherung im Bereich der Hemidesmosomen; Splicevarianten von Laminin und Integrin zusammen mit Proteinen wie BP180 und Adaptor-Proteinen (Ad), sowie Aktin- bzw. Zytokeratinfilamenten (AF, ZKF), Ankerfilamenten (AnkF), Kollagenfibrillen (KFi) und Perlecan (Per) binden hier die Zelle und die Lamina fibroreticularis an die Lamina densa. Abbildung aus [32].

Das wichtigste adhäsive Glykoprotein ist Laminin, welches sich aus drei Ketten zusammensetzt (α -, β - und γ -Kette) [15]. Diese Polypeptidketten sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft und ordnen sich in der Gestalt eines asymmetrischen Kreuzes an [24, 42]. Es besitzt eine hohe Affinität zu Kollagen-IV der Lamina densa und erlaubt somit den Epithelzellen über Integrine am Bindegewebe zu haften. Außerdem bindet es an weiteren extrazellulären Komponenten wie z.B. Seitenketten von Proteoglykanen (u.a. Syndecan und Perlecan) und Integrin, aber auch an Adhäsionsrezeptoren der Zelloberfläche.

Kollagen-IV bildet das Grundgerüst der Lamina densa der Basallamina. Das Baumerkmal aller Kollagenmoleküle, die heteromere Tripelhelix, ist mehrfach durchbrochen und erreicht dadurch eine erhöhte Flexibilität. Durch die Verankerung des Laminins in der kollagenreichen Basallamina wird die Bindung an Integrine [43] und damit an eine Verknüpfung der Zelle mit dem extrazellulären Raum gefestigt. Der heterodimere Aufbau des Integrins aus α - und β -Untereinheiten, von denen 14 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten bisher identifiziert wurden [15], ermöglicht eine vielfältige Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen. Für die Bindung an Kollagen und Laminin sind die besonders in Basalzellen exprimierten $\alpha1\beta1$ -, $\alpha2\beta1$ - und $\alpha3\beta1$ -Integrin-Rezeptoren verantwortlich [15].

Die starke Verankerung der epidermalen Stammzellen ist folglich besonders an ihre hohe Integrin-Expression gebunden und erlaubt somit dieses Integrin als Marker für Stammzellen zu nutzen. Für den hier folgenden Versuchsaufbau wurde die durch diese Transmembranproteine gesicherte Zell-Matrix-Adhäsion, also letztlich ihre bindende Eigenschaft zur Isolation verwendet. Durch die Separation von Zellen unterschiedlich starker Affinitäten zu Kollagen-IV und Laminin sollen Populationen mit erhöhter Integrin-Expression (epidermale Stammzellen) von den Zellen mit geringer Integrin-Expression getrennt werden.

1.5 Tissue Engineering

Defekte im Bereich der Mundschleimhaut in Folge von Traumata, angeborenen Defekten (z.B. Gaumen-Spalte) und erworbenen Krankheiten (z.B. Krebs, Erkrankungen des Zahnhalteapparates) stellen schwerwiegende gesundheitliche Probleme dar [44]. Die für den Wundverschluss benötigte Mundschleimhaut ist mit dem limitierten Eigengewebe nur schwer zu ersetzen und bewirkt im Zuge der Operation oft Narben und Funktionseinschränkungen. Während der letzten Jahrzehnte wurde die Schleimhaut in Form von autologen, freien Spalthaut- und Vollhaut-Transplantaten substituiert [45, 46]. Zu den Problemen mit diesen Methoden zählen unter anderem die unvorhersehbare Lebensdauer des Lappens, Kontraktionen, Haarwuchs, Funktionseinschränkungen (vor allem im Bereich der Spenderregion) [47] und Schwierigkeiten bei der nachfolgenden prothetischen Versorgung.

Mit Hilfe von Tissue Engineering sollen beschädigte Gewebe und Organe durch biologisch kompatible und funktionelle Transplantate aus primären autologen Zellen und einer Matrix (Scaffold) ersetzt werden. Für die Entwicklung von Transplantaten aus patienteneigenen Zellen werden primäre Zellen isoliert und durch Zellkulturtechniken angereichert bis genügend vermehrungsfähige Zellen für die Besiedlung einer Matrixstruktur oder für die Zelltherapie zur Verfügung stehen [48]. Da diese Zellkulturtechniken zur Vermehrung von leistungsstarken autologen Zellen insbesondere auf dem Gebiet der Mundschleimhaut weitestgehend unerprobt sind, ergibt sich die Wichtigkeit dieser Untersuchung zur Steigerung der Proliferationsfähigkeit primärer humaner Keratinozyten aus oraler Mukosa durch Anreicherung von humanen epidermalen Stammzellen durch Adhäsion an Kollagen-IV- und Laminin-beschichteten Zellkulturgefäßen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der experimentellen Untersuchungen war es, rasch vitale und hoch proliferative Keratinoblasten im Zellkultursystem zu isolieren und zu vermehren, um die Verfügbarkeit der Zellen und damit den Prozess für die Bildung eines Schleimhauttransplantates zu beschleunigen. Konkret sollte untersucht werden, ob durch die Anreicherung von humanen epidermalen Stammzellen die Proliferationsfähigkeit primärer humaner Keratinozyten gesteigert werden kann.

Die Versuche orientierten sich an den Erkenntnissen der von Stein et al. 2006 untersuchten Proliferationskapazität oraler Keratinozyten nach Adhäsion an Kollagen-IV-beschichteten Zellkulturgefäßen [27]. Unter Hinzufügen einer weiteren Komponente der extrazellulären Matrix (Laminin) zur Versuchsreihe und eines Adhäsionstests an unbeschichteten Platten sollten Wachstumskurven erstellt werden, die den Verlauf der Entwicklung der Zellen über einen gewissen Zeitraum dokumentieren und es ermöglichen, zwischen den adhären und nicht-haftenden Populationen zu vergleichen. Zudem sollte eine Einschätzung der drei angewendeten Methoden zur Quantifizierung der Zellproliferation und Zellvitalität in Bezug auf deren praktische Durchführbarkeit und Qualität gegeben werden.

3 Material

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Folgende Geräte wurden für die Arbeit verwendet:

Absaugpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Brutschrank	Hera Cell, Heraeus, Hanau
Eppendorf-Gefäß	Standard Reaktionsgefäß 3810X, Eppendorf, Hamburg
Kamera mit Mikroskopieaufsatz	Digital-Kamera EC3, Leica, Solms
Lichtmikroskop	CK40, Olympus, Japan Leitz DM RBE, Leica, Wetzlar
Microtest-96-Well-Zellkulturplatten	BD Falcon™, Heidelberg
Photometer	Rainbow, Tecan, Schweiz
Pipetten	Eppendorf 10, 20, 100, 200, 1000 Eppendorf Multipipette plus, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet®, Brand, Wertheim
Sterile Werkbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Universal 320 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Unbeschichtete 12-Well-Zellkulturplatten	BD Falcon™, Heidelberg
Vorbeschichtete 12-Well-Zellkulturplatten	BD BioCoat™ (Kollagen Typ-IV, Laminin), Heidelberg
Wasserbad	GFL, Julabo, Seelbach
Zellkulturschalen	Nunclon Surface, Nunckbrand, Dänemark
Zellschaber	CellScraper, Greiner, Frickenhausen
Zellzählgerät	CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System Modell TTC, Schärfe Systeme, Reutlingen

Real-Time-Zellanalyse	xCELLigence System, Real-Time Cell Analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
-----------------------	---

3.2 Medien

Dulbecco's Modified Eagles Medium mit Gerinnungsfaktor 12 (D-MEM/Ham's F-12) (GIBCO®, Invitrogen™)

Gebrauchsfertiges Flüssigmedium mit folgenden Zusätzen auf 500 ml:

+ 10 % FCS (= 50 ml) + 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung (= 5 ml) + 0,1 % Fungizone (= 0,5 ml). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 1: Zusammensetzung D-MEM/Ham's F-12 [49]

Komponenten	Konzentration (mg/L)	mM
Aminosäuren		
Glycin	18,75	0,25
L-Alanin	4,45	0,05
L-Arginin HCl	14,5	0,699
L-Asparagin H ₂ O	7,5	0,05
L-Asparaginsäure	6,65	0,05
L-Cystein HCl H ₂ O	17,56	0,0998
L-Cystin 2HCl	31,29	0,1
L-Glutaminsäure	7,35	0,05
L-Glutamin	365	2,5
L-Histidin HCl H ₂ O	31,48	0,15
L-Isoleucin	54,47	0,416
L-Leucin	59,05	0,451

L-Lysin HCl	91,25	0,499
L-Methionin	17,24	0,116
L-Phenylalanin	35,48	0,215
L-Prolin	17,25	0,15
L-Serin	26,25	0,25
L-Threonin	53,45	0,449
L-Tryptophan	9,02	0,0442
L-Tyrosin	55,79	0,214
L-Valin	52,85	0,452
Vitamine		
Biotin	0,0035	0,0000143
Cholinchlorid	8,98	0,0641
D-Calcium-Pantothenat	2,24	0,0047
Folsäure	2,65	0,00601
Nicotinsäureamid	2,02	0,0166
Pyridoxin HCl	2	0,00971
Riboflavin	0,219	0,000582
Thiamin HCl	2,17	0,00644
Vitamin B12	0,68	0,000502
i-Inositol	12,6	0,07
Anorganische Salze		
Calciumchlorid (CaCl ₂) wfr.	116,6	1,05
Kupfer(II)-sulfat (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,0013	0,0000052
Eisen(III)-nitrat (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,05	0,000124
Eisen(II)-sulfat (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,417	0,0015
Magnesiumchlorid wfr.	28,64	0,301
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) wfr.	48,84	0,407
Kaliumchlorid (KCl)	311,8	4,16
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)		

Natriumchlorid (NaCl)	2438	29,02
di-Natriumdihydrogenphosphat (NaHPO ₄) wfr.	6995,5	120,61
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	71,02	0,5
Zinksulfat (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	62,5	0,453
	0,432	0,0015
Sonstige		
D-Glucose (Dextrose)	3151	17,51
Hypoxanthin Na	2,39	0,015
Linolsäure	0,042	0,00015
Liponsäure	0,105	0,00051
Phenolrot	8,1	0,0215
Putrescin 2HCl	0,081	0,000503
Natriumpyruvat	55	0,5
Thymidin	0,365	0,00151

Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM) (Promocell)

Vor der Verwendung wurden dem Nährmedium neben dem auf -20 °C gelagerten „SupplementMix“ noch 60 µl 0,5 M CaCl₂ und 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung zugefügt. Die finalen Konzentrationen der ergänzenden Faktoren sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 2: Konzentration nach Zugabe des „SupplementMix“ im KGM 2 [50]

Bovine Pituitary Extract	0,004 ml/ml
Epidermal Growth Factor (recombinant human)	0,125 ng/ml
Insulin (recombinant human)	5 µg/ml
Hydrocortison	0,33 µg/ml
Epinephrin	0,39 µg/ml
Transferrin holo (human)	10 µg/ml
CaCl ₂	0,06mM

3.3 Medienzusätze

FCS (PAN)

Das fetale Kälberserum wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Dem Nährmedium wurde es nach 30-minütiger Hitzeinaktivierung bei 56 °C in einer Konzentration von 10 % zugefügt.

Fungizone-Lösung (GIBCO®, Invitrogen™)

Die gebrauchsfertige Lösung enthält Amphotericin B in einer Konzentration von 250 µg/ml. Dem Medium wurde das Antimykotikum in einer Konzentration von 0,1 % zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Penicillin-/Streptomycin-Lösung (PAN)

Die gebrauchsfertige, vom Hersteller steril filtrierte Antibiotikallösung enthält 10 mg Streptomycin sowie 10.000 Units Penicillin/100 ml. Die Lösung wurde dem Nährmedium in einer Konzentration von 1 % zugesetzt.

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

DMSO (Dimethylsulfoxide) (Sigma-Aldrich)

Das Zufügen einer 5 ml DMSO-Ampulle auf 45 ml Zellmedium (D-MEM/Ham's F-12 mit folgenden Zusätzen auf 500 ml: + 10 % FCS (= 50 ml) + 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung (= 5 ml) + 0,1 % Fungizone (= 0,5 ml)) ergeben 50 ml Kryomedium, welches in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei -20° C gelagert wurde.

3.4 Puffer, Lösungen und Enzyme

Alfazyme (GIBCO®, Invitrogen™)

Die gebrauchsfertige Lösung diente zum Ablösen der Zellen bei der Passagierung von Zellkulturen. Alfazyme besitzt proteolytische und kollagenolytische Aktivität.

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Dispase II (Roche)

Das Enzym Dispase wird für die Trennung der Zellen bei der Ernte von Zellkulturen verwendet und verhindert so unerwünschtes Verklumpen der Zellen in Suspension.

DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered Saline) –Puffer (GIBCO®, Invitrogen™)

Der gebrauchsfertige Puffer (flüssige Salzlösung, ohne Mg^{2+} , ohne Ca^{2+} , steril filtriert) wird als Spülflüssigkeit und zum Entfernen von Mediumresten aus Zellkulturgefäßen verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung von DPBS [51]

Komponenten	Konzentration (mg/L)	mM
Anorganische Salze		
Dinatriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)	2160	8,06
Kaliumchlorid (KCl)	100	2,67
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	200	1,47
Natriumchlorid (NaCl)	8000	137,93

CASY[®]ton (Roche)

Als Vorbereitung für die Zellzählung wurde zur Bildung einer Suspension mit den Zellen eine isotone Lösung verwendet.

Trypsin (Biochrom)

Die verwendete Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, 10-fach konzentriert, 0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA) wird mit Aqua dest. 1:10 verdünnt, in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Das Reagenz diente zum Ablösen von Zellschichten aus dem Zellkulturgefäß (wie Alfazyme) für die anschließende Zellzählung.

Versene (GIBCO[®], Invitrogen[™])

Der EDTA-basierte Komplexbildner wurde zur Entfernung von mitwachsenden Fibroblasten in der Kulturschale unter Erhalt der Keratinozyten verwendet.

Inhalt: 0,2 g EDTA / L Kochsalzlösung Konzentration 0,53 mM

WST-1 Cell Proliferation Reagent (Roche)

Das wasserlösliche Tertazoliumsalz kam bei der Messung der Zellproliferation mittels Farbnachweistest zur Anwendung.

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

3.5 Patienten und Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial der Zellkulturversuche wurde im Rahmen von Routineoperationen nach schriftlicher Zustimmung der Patienten in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg in Form von Mundschleimhautproben gewonnen.

4 Methoden

Die Versuche zur Steigerung der Proliferationsfähigkeit primärer humaner Keratinozyten aus oraler Mukosa im Zellkultursystem orientieren sich an den Erkenntnissen der von Stein et. al 2006 durchgeführten Untersuchung zur Proliferationskapazität oraler Keratinozyten nach Adhäsion an Kollagen-IV-beschichteten Platten [27]. Unter Hinzufügen einer weiteren Komponente der extrazellulären Matrix, Laminin, zur Versuchsreihe und eines Adhäsionstests an unbeschichteten Zellkulturgefäßen sollten Wachstumskurven erstellt werden, die den Verlauf der Entwicklung der Zellen über einen gewissen Zeitraum dokumentieren und es ermöglichen, zwischen den adhären und nicht-haftenden Populationen, sowie den Beschichtungen zu vergleichen.

4.1 Gewinnung und Isolation der Zellen

4.1.1 Gewinnung humaner oraler Keratinozyten

Die humanen, oralen Keratinozyten für die Zellversuche wurden von 22 klinisch gesunden Patienten im Alter von 19 bis 81 Jahren im Rahmen verschiedener chirurgischer Eingriffe im Bereich der Mundhöhle in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg gewonnen. Für die ergebnisrelevanten Versuche konnten 12 Proben (Durchschnittliches Alter 40,8 Jahre) verwendet werden, die restlichen Zellen wurden eingefroren oder verworfen.

Die Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg lag vor. Eine schriftliche Einwilligung zur Entnahme und experimentellen Verwendung der Schleimhaut existierte.

Für die Gewinnung der humanen, oralen Keratinozyten wurde eine ca. 0,3 – 0,6 cm² große Probe entnommen und, wie im Folgenden beschrieben, weiterverarbeitet.

4.1.2 Explantation und Isolation oraler Keratinozyten

Die Isolation der oralen Keratinozyten erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Die gewonnenen Mundschleimhaut-Stücke wurden zunächst in 70 % EtOH für 5 Minuten desinfiziert und anschließend dreimal für je 5 Minuten mit DPBS gewaschen. Nach der mechanischen Trennung von Epithel- und Bindegewebe mittels Skalpell wurde der epitheliale Anteil in ca. 0,5 mm große Explantate zerschnitten und in zwei Kulturschalen ausgelegt. Dem fertigen Flüssigmedium D-MEM/Ham's F12 Medium wurden 10 % fetales Kälberserum (FCS, 50 ml), 1 % Penicillin-/Streptomycin-Lösung (P/S, 5 ml) und 0,1 % Fungizone-Lösung (500 µl) zugesetzt und jede Kulturschale mit 10 ml des Mediums aufgefüllt. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre aus 95 % Sauerstoff und 5 % CO₂ im Brutschrank.

4.1.3 Separationsmethode zur Verhinderung der Kontamination mit Fibroblasten

Trotz sauberer Trennung der Epidermis von der Dermis waren die Primärkulturen gelegentlich und unterschiedlich stark von Bindegewebszellen kontaminiert. Schon nach kurzer Kultivierungszeit hätte das erhöhte Fibroblastenwachstum zu einem Überwachsen der Keratinozyten-Kultur geführt, weswegen schon in den ersten Tagen nach der Aussaat folgende Separationsmethoden angewandt wurden, um in den folgenden Passagen Reinkulturen der Zellen zu erhalten.

Nach zweimaligem Spülen der Kulturschale mit DPBS wurden die Zellen mit 5 ml Versene überschichtet. Die Einwirkungszeit betrug 6 Minuten im Brutschrank. Daraufhin erfolgte durch eine mikroskopische Kontrolle, ob eine ausreichende Ablösung erreicht wurde. Nun wurden die Fibroblastenreste mittels eines Zellschabers mechanisch von der Oberfläche der Kulturschale gelöst und mit DPBS abgespült. Teilweise konnte auch auf die Versene-Behandlung verzichtet werden, da es gelang mittels Zellschabers eine mechanische Ablösung der Fibroblasten zu erreichen. Nach der Zugabe von 10 ml des Nährmediums wurde die Kultivierung der Keratinozyten unter ständiger Kontrolle und gegebenenfalls erneuter Separation fortgesetzt.

4.2 Kultivierung der Zellen

4.2.1 Zellkultur, Passagierung, Zellzählung

Der Mediumwechsel fand alle 2 – 3 Tage statt, während sich die Keratinozyten kreisförmig um die Explantate vermehrten. Das alte Medium wurde mittels steriler Glaspipette und Vakuumpumpe abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. So konnten die losen Gewebstücke nach ca. 7 Tagen entfernt werden. Die Explantation wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und dokumentiert. Bei Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz wurden die Zellen geerntet und für eine neue Passage vorbereitet. Dies geschah wie folgt:

Für das Ablösen der Zellen wurde zunächst das vorhandene Medium aus der Kulturschale abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen, um sie dann mit 5 ml Alfazyme zu überschichten. Nach einem 10 – 15 minütigen Aufenthalt im Brutschrank ließen sich die stark aneinander adhären Zellen mit der Pipette leicht von der Kulturschale abspülen, aufsaugen und in ein Eppendorf-Gefäß überführen. Zum Erreichen einer homogenen Suspension aus einzelnen Zellen wurde die zusammenhängende Zell-Lage mit 300 µl Dispase II für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin folgte nach mehrfacher Resuspension eine Kontrolle, ob sich die Zellen schon ausreichend voneinander getrennt hatten (gegebenfalls wurde die Inkubationszeit um drei Minuten verlängert). Für das Zentrifugieren (rpm - 1000, Zeit - 5 min, RT) wird eine 1:1 Lösung der im Eppendorf-Gefäß vorhandenen Menge an Suspension und KGM erstellt und nach diesem Vorgang der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Die Resuspension des Pellets erfolgte mit 1 ml KGM, von dieser Zelllösung wurden 10 µl in 10 ml Isoton für die Zellzählung (siehe Kapitel 4.5.1) verwendet.

Nach Feststellung und Dokumentation der Zellzahl wurde die Passagierung mit 1×10^6 Zellen fortgeführt. Diese wurden erneut auf einer Kulturschale ausgesät und mit 10 ml Standardkulturmedium für Keratinozyten KGM versorgt. Der Wechsel des Mediums fand im Abstand von 2 Tagen statt. Die Zellen der Passage 2 wurden für die Experimente verwendet.

4.3 Anreicherung epidermaler Stammzellen

Angelehnt an die von Stein et al. 2006 erprobte Methode zur Gewinnung oraler Keratinozyten mit hohem proliferativem Potential durch Adhäsion der Zellen an Kollagen-IV-beschichtete Multiwellplatten erfolgte die Anreicherung epidermaler Stammzellen über die Adhäsion an beschichteten und unbeschichteten Zellkulturgefäßen. Nach Kultivierung der isolierten Keratinozyten in der zweiten Passage konnten diese Zellen erneut geerntet und neben aufgetauten kryokonservierten Zellen für die im Anschluss beschriebenen verschiedenen Wege zur Anreicherung von Stammzellen verwendet werden. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und das Zellkulturgefäß dreimal mit PBS gespült. Um die Ablösung der Zellen zu erreichen, wurden diese mit 5 ml Trypsin/EDTA überschichtet und für ca. 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin folgte das Abstoppen der Enzymreaktion mit 500 µl 10 % FCS und die Zugabe von weiteren 5 ml KGM. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (rpm - 1000, Zeit - 5 min, RT). Die Resuspension des entstandenen Pellets erfolgte mit 5 ml KGM, von dieser Zelllösung wurden 10 µl in 10 ml Isoton für die Zellzählung verwendet. Nach Ermittlung der Anzahl der Keratinozyten wurden je 1×10^6 Zellen für die verschiedenen Adhäsionsversuche zurückgehalten, während von den restlichen Zellen je $2,5 \times 10^4$ Zellen in 2ml KGM aufgenommen und als Kontrollpopulation auf sechs Wells mit einer Wachstumsfläche von $3,9 \text{ cm}^2$ (12-Well-Zellkulturplatte) aufgetragen wurden. Somit konnte vom ersten Tag nach Aussaat beginnend das Wachstum der Zellen beobachtet und nach der Ernte quantitativ bestimmt werden. Im Abstand von 2 Tagen wurden die

Keratinocyten aus ihren Zellkulturgefäßen geerntet, sodass über die Messungspunkte von d1, d3, d5, d7, d9 und d11 eine Wachstumskurve entwickelt werden konnte.

4.3.1 - Adhäsion an unbeschichteten Platten

Die zurückgehaltenen 1×10^6 Zellen einer Probe wurden in 5ml KGM auf eine $9,6 \text{ cm}^2$ Wachstumsfläche einer 6-Well-Zellkulturplatte aufgetragen und für 20 Minuten bei 37°C im Brutschrank (5 % CO_2 Atmosphäre, 90 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit den nicht am Plattenboden adhärennten Zellen mit einer Pipette abgenommen und in ein Falcon überführt. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA auf die übrigen adhärennten Zellen konnten diese abgelöst und ebenfalls in ein Falcon überführt werden. Dieses Röhrchen wurde mit 3 ml KGM aufgefüllt und für die Zentrifuge vorbereitet. Somit konnten die beiden Populationen der am Boden haftenden Zellen und der im Überstand befindlichen Zellen voneinander getrennt werden. Nach der Zellzählung mit $10 \mu\text{l}$ aus 1 ml Suspension für CASY, erfolgte wie oben bei der Kontrollgruppe beschrieben die Aussaat von je $2,5 \times 10^4$ Zellen in 2 ml KGM pro Well mit einer Wachstumsfläche von $3,9 \text{ cm}^2$ (12-Well-Zellkulturplatte). Es wurden ebenfalls sechs Vertiefungen pro Population (haftend und nicht-haftend) befüllt, um Wachstumskurven über einen Zeitraum von elf Tagen zu erhalten. Die Zellkultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2 Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 90 %.

4.3.2 - Adhäsion an Kollagen-IV-beschichteten Platten

Der in Kapitel 4.3.1 beschriebene Versuch mit unbeschichteten Zellkulturgefäßen wurde mit Kollagen-IV-beschichteten Multiwellplatten wiederholt, um auch hier eine Separation zwischen den adhärennten und nicht-haftenden Keratinocyten zu erreichen.

4.3.3 - Adhäsion an Laminin-beschichteten Platten

Die Adhäsion der verwendeten Zellen der 2. Passage an Laminin-beschichteten Platten erfolgte ebenfalls nach der im Kapitel 4.3.1 beschriebenen Versuchsanordnung.

Es wurde stets drauf geachtet, dass die Zellen keinen langen Zeiträumen außerhalb des Brutschrankes ausgesetzt waren.

4.3.4 Versuchsanordnung für Real-Time-Zellanalyse

Die vorangegangene Versuchsbeschreibung trifft für die Auszählung der Zellen mittels Impedanzmessung nur für die Adhäsion an den verschiedenen Platten zu. Die Beschreibung der weiterführenden Maßnahmen, d.h. Aussaat der Zellen, Messprinzip und Erstellung von Wachstumskurven enthält Kapitel 4.5.3.

4.4 Langzeitlagerung

4.4.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von Zellen dient der Konservierung (= Kryokonservierung). Zunächst wurde unter der sterilen Werkbank das Medium vollständig abgesaugt und die Zellkultur einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Alfazyme überschichtet und 10 – 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dem vorsichtigen Ablösen der Zellen von der Petrischale mit der 1 ml Pipette konnte der zusammenhängende Bestandteil aus Zellen in ein Eppi-Cap überführt und mit 300 µl Dispase II für 10 min in den Brutschrank gegeben werden. Es folgte, nach guter Resuspension, eine Kontrolle ob sich die Zellen schon ausreichend voneinander getrennt hatten, indem ein Tropfen der Zelllösung unter dem Mikroskop betrachtet wurde. War dies noch nicht geschehen, wurde die Inkubationszeit im Brutschrank um drei Minuten verlängert.

Die Zellsuspension wurde mit derselben Menge KGM aufgefüllt und bei 1000 RPM für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette entfernt und zu dem zurückbleibenden Zellpellet 1 ml KGM hinzugefügt. Im Anschluss an die Resuspension erfolgte eine Zellzählung mit 10 µl Zelllösung in 10 ml Isoton (Gerät CASY).

Durch einen erneuten Waschvorgang (Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes) wurden die Zellen für die Konservierung vorbereitet. Das Sediment wurde in 2 ml Kryomedium aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt.

Die Proben wurden zunächst zum Vorkühlen für 1–2 Wochen in einer Isopropanol-Box bei -80°C gelagert und anschließend in einem Flüssigstickstoff-Tank (-196 °C) verwahrt.

Für den Auftauprozess der eingefrorenen Zellen wurden die aufzutauenden Kryo-Röhrchen aus dem Flüssigstickstoff genommen und in ein 37 °C-Wasserbad gehalten. Diese Maßnahme sollte die toxische Wirkung des bei der Kryokonservierung hinzugefügten DMSO minimieren. In ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen (Falcon) wurden 8 ml vorgewärmtes KGM vorgelegt und die rasch aufgetauten Zellen dazugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass durch mehrmaliges Spülen des Kryo-Röhrchens mit dem vorgelegten Medium möglichst wenige Zellen verloren gehen. Nach dem Zentrifugieren (5 min mit 1000 Umdrehungen) wurde der entstandene Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 5 ml KGM resuspendiert. Das Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurde wiederholt und das Röhrchen mit 1 ml KGM aufgefüllt. Nach ausreichender Resuspension wurde mit 10 µl Zelllösung eine Zellzahlbestimmung durchgeführt und mit der gewollten Menge an Zellen eine neue Kultur/Passage angelegt.

4.5 Methoden zur Quantifizierung der Zellproliferation und Zellvitalität

4.5.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Zellzählgerät

Die Konzentrationsbestimmung von Zellsuspensionen erfolgte mit dem CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System, Modell TTC (Schärfe Systeme, Reutlingen). Das Bestimmungsverfahren beruht auf einer Kombination aus den Prinzipien der Widerstandsmessung und der Pulsflächenanalyse zur Signalauswertung. Hierfür werden die Zellen in der isotonen Elektrolytlösung CASY[®]ton suspendiert und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine 150 µm Messkapillare gesaugt. Durch ein an die Kapillarstrecke angelegtes Spannungsfeld stellt die Messpore einen definierten elektrischen Widerstand dar. Dieser wird erhöht, sobald eine intakte Zelle durch die Pore tritt, da sie eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung verdrängt. Intakte Zellen fungieren somit, im Gegensatz zu toten Zellen, bei denen die Zellmembran keine elektrische Barriere mehr darstellt, näherungsweise als Isolatoren (Abb. 6 [52]). Die von ihnen ausgelöste Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen, vorausgesetzt sie passieren die Messpore einzeln [53]. Die Größenverteilung der Zellen wird durch die Pulsflächenanalyse aufgezeichnet und die Anzahl der vitalen Zellen angegeben [52].

Es wurde ein Messbereich zwischen 0 und 40 µm vorgewählt und das Messfenster für lebende Zellen, orientierend an der Normalverteilung der Zellgröße von Keratinozyten, zwischen 11 und 40 µm festgelegt. Vor der Messung wurden 10 µl Zellen in ein mit 10 ml CASY[®]ton befülltes Zählröhrchen CASY[®]cup gegeben und durch mehrmaliges Schwenken auf die Zählung vorbereitet. Je Probe wurden automatisch drei Einzelmessungen mit Volumina von je 200 µl durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Mittels der integrierten Auswertungssoftware CASY[®]stat wurde der Verdünnungsfaktor eingerechnet und die Zellzahl pro 1 ml unverdünnter Suspension angegeben.

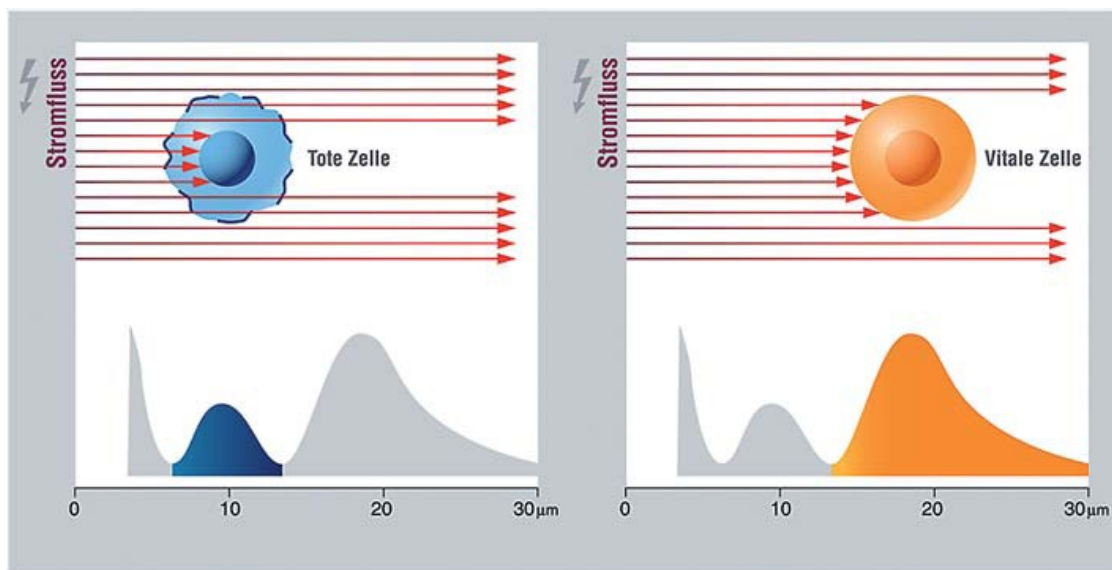


Abbildung 6:
Schematische Darstellung vitaler Zellen als elektrische Isolatoren im Gegensatz zu toten Zellen, deren zytoplasmatischer Raum durch die defekte Membran leitfähig wird. [52]

4.5.2 Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1-Test

Die Zellvitalität wurde mittels eines WST-1-Tests bestimmt. Hierbei handelt es sich um den Nachweis einer intakten Atmungskette in Zellen, welcher auf dem Umsatz von Tetrazoliumsalz basiert. Dieses wurde von vitalen Zellen mittels mitochondrialer Succinatdehydrogenase reduktiv zu wasserlöslichem Formazan aufgespalten [54] (Abbildung 7 [55]). Das Produkt spiegelt den Zellmetabolismus und die Zellintegrität wider und kann photometrisch gemessen werden. Die Intensität des Farbumschlags verhält sich dabei proportional zum Enzymumsatz und damit zur Zellvitalität sowie zur metabolischen Aktivität der Zelle.

Zunächst wurde als vorbereitende Maßnahme das Medium der zu messenden Probe abgesaugt. Anschließend wurde 300 µl KGM sowie 30 µl WST-1-Reagenz zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C unter 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Resuspension der Probe mittels einer sterilen Pipette erfolgte die Übertragung von 100 µl in ein Fach einer 96-Well-Platte.

Die Messung der Absorption des während der Reaktion gebildeten Formazan-Salzes fand bei einer Wellenlänge von 440 nm statt. Die Wellenlänge des Referenzfilters betrug 690 nm. Zur Kontrolle wurde bei jeder Messung 100 µl einer Probe von 300 µl Kulturmedium plus 30 µl WST-1-Reagenz als Leerwert mitgemessen.

Die Messung wurde nach weiteren 30 min wiederholt.

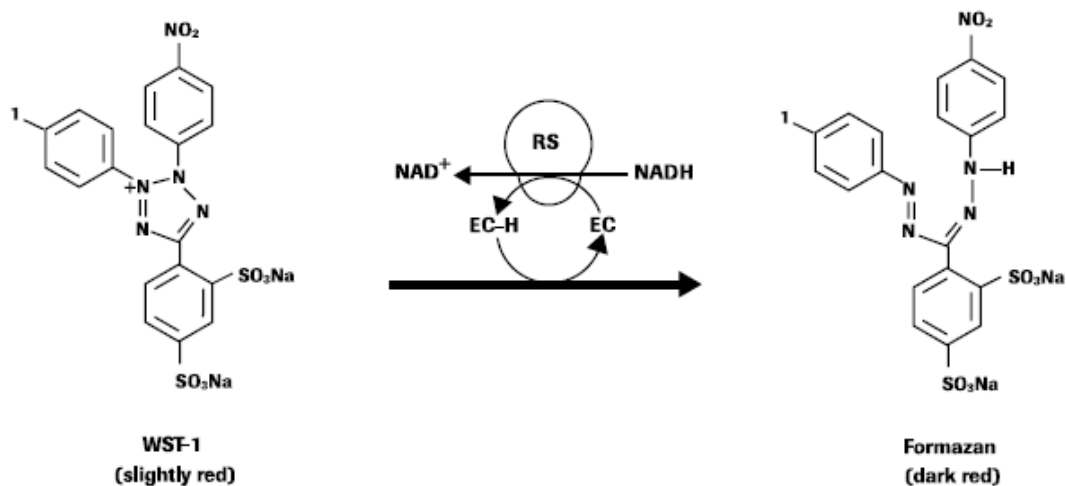


Abbildung 7:

Aufspaltung des Tertazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat) zu Formazan. (EC = Elektronen-Kopplungsreagenz, RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reductase-System) [55]

4.5.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Impedanzmessung

Das xCELLigence System von Roche Applied Science besteht aus einer Analyseeinheit, die mit Hilfe der RTCA Software der Kontrolleinheit die Impedanz (Wechselstromwiderstand) misst. Die Signale für die Messung erhält sie von einer Messstation mit einer 96-Well-Zellkulturplatte, in deren Vertiefungen goldene Mikroelektroden integriert sind. Diese Station wird im Brutschrank aufbewahrt und gewährleistet somit alle Voraussetzungen für die Zellkultur hinsichtlich Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Konzentration. Die Veränderung der Impedanz wird kontinuierlich in Echtzeit dokumentiert und beruht auf der Wechselwirkung zwischen

den Zellen und den elektrischen Sensoren. Sie wird als dimensionsloser Cell-Index-Wert (CI) angegeben und beinhaltet Informationen über Zellzahl, -viabilität, -morphologie und den Grad der Adhäsion. Ohne Zellen ist der Widerstand (Z) gleich null und wird somit als Ausgangswert herangezogen. Sobald sich jedoch Zellen an den im Boden integrierten Elektroden anheften, kommt es zu einer Erhöhung der Impedanz. Diese steigt weiter an, je mehr Zellen adhären bzw. je stärker sie sich auf der Kulturfäche ausbreiten (Abb. 8 [56]). So lässt sich die Proliferation der Zellen von Beginn der Aussaat aufzeichnen und verfolgen.

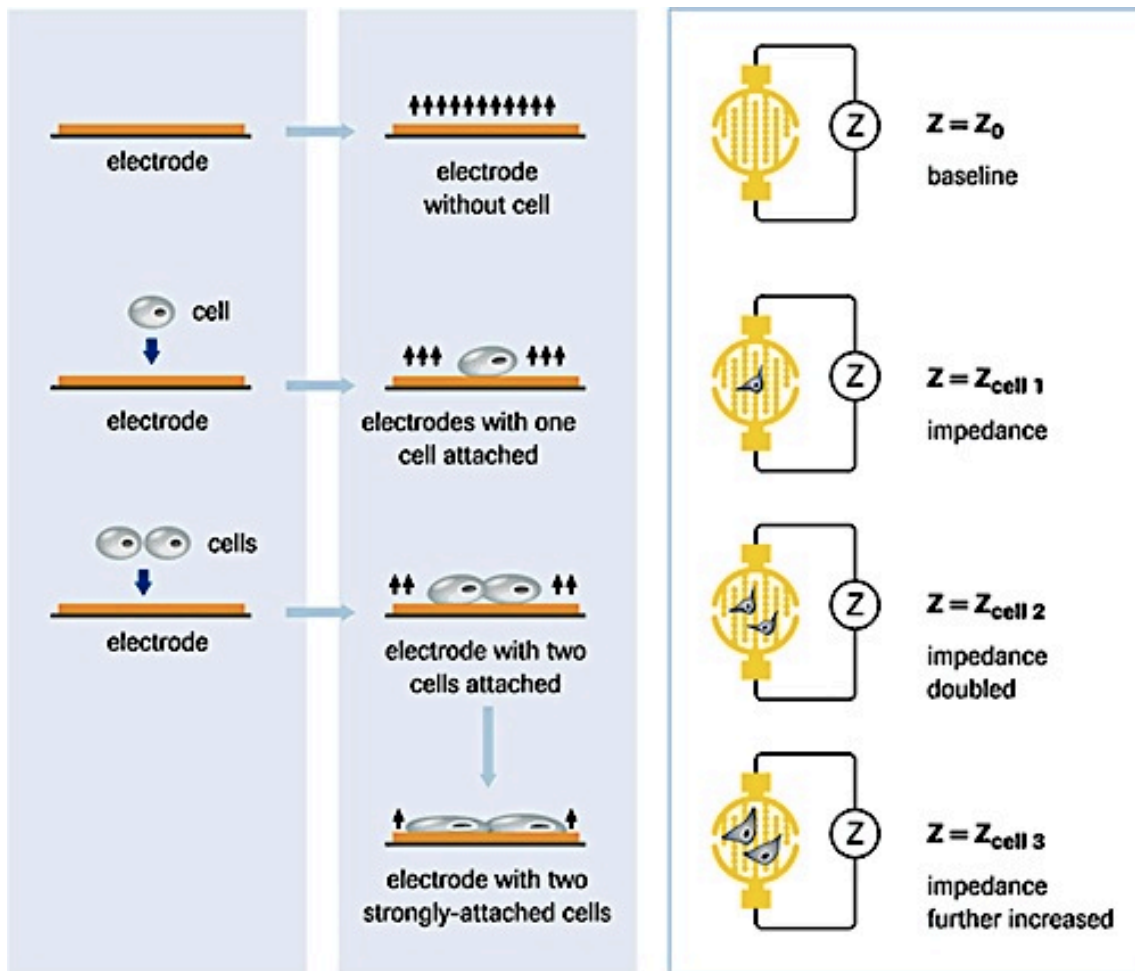


Abbildung 8:
Messprinzip des xCELLigence Systems von Roche Applied Science [56]

Wie ab Kapitel 4.3.1 beschrieben, erfolgte zunächst die Anreicherung der epidermalen Stammzellen durch Adhäsion an mit Komponenten der Basalmembran beschichteten Zellkulturgefäßen. Nach der Auftrennung der verschiedenen Populationen (haftend und nicht-haftend) der auf Kollagen-IV, Laminin und unbeschichteten Platten ausgesäten Zellen konnte die E-Plate mit den Versuchsansätzen für den Beginn der Messung vorbereitet werden. Hierfür wurden von den jeweiligen Fraktionen je $2,5 \times 10^4$ Zellen in 100 µl KGM aufgenommen und systematisch in den Wells der Mikrotiterplatte platziert. Dies geschah für jede Probe dreimal, um eine Mittelung der Werte als Ergebnis nutzen zu können. Das Messprotokoll war wie folgt aufgebaut: Nach der anfänglichen Adhäsionsphase wurde der Zellindex ab der 20. Minute alle 5 Minuten erfasst. Nach ca. 4 h erfolgte die Dokumentation alle 30 Minuten und ab 12 Stunden wurde die Impedanz in stündlichen Zeitabschnitten aufgezeichnet. Die Messungen endeten nach 113 Stunden; dies entspricht einem Zeitraum von über vier Tagen kontinuierlicher Überwachung der Zellproliferation. Nach Berechnung der Mittelwerte der Triplikate mit Hilfe der RTCA-Software konnte die Auswertung der Zellindex-Werte in Abhängigkeit der Zeit in einem Diagramm dargestellt werden.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse umfasste die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichungen und wurde mit Hilfe der Computerprogramme IBM SPSS 19 sowie Microsoft Excel bewerkstelligt. Für die Auswertung der unterschiedlichen Proliferation der Zellen je nach verwendeter Beschichtung wurden die Daten bei Normalverteilung mit Hilfe der Varianzanalyse für Messwiederholungen (Allgemeines lineares Modell) auf statistische Signifikanz geprüft. Als signifikant werden Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ bezeichnet. Zu den Ergebnissen wurden deskriptive Statistiken in Form von Tabellen und Diagrammen erstellt.

Vereinzelt zeigte sich aufgrund der geringen Anzahl von Proben ($n = 5 - 8$) eine hohe Streubreite, die durch die Verwendung primärer Zellen und der damit verbundenen individuellen Unterschiede der einzelnen Spender erklärt werden kann.

5 Ergebnisse

5.1 Explantation und Isolation humaner oraler Keratinozyten

Mit der unter Kap. 4.1.2 beschriebenen Methode erfolgte die Isolation primärer Keratinozyten aus der Mundschleimhaut. Je nach Größe der Probe (0,3 – 0,6 cm²) konnten meist zwei Kulturschalen mit je 10 – 15 Epidermis-Explantaten gewonnen und kultiviert werden. Die Zellen begannen etwa nach 3 – 4 Tagen herauszuwachsen und waren an ihrer pflastersteinartig gefelderten Morphologie mikroskopisch gut zu erkennen. Die Ernte der Keratinozyten erfolgte im Durchschnitt nach 25 Tagen, wobei eine durchschnittliche Ausbeute von ca. $3,6 \times 10^6$ Zellen pro Schale erzielt werden konnte. Es zeigten sich deutliche Schwankungen der Zellanzahl unabhängig von Geschlecht oder Alter des Spenders.

Tabelle 4:
Anzahl der geernteten Keratinozyten nach Explantation verschiedener Spenderproben

Spender	Geschlecht	Alter	Zellen/ml
156	m	57	$1,93 \times 10^6$
158	m	81	$2,20 \times 10^6$
159	m	22	$7,31 \times 10^6$
174	w	44	$1,05 \times 10^6$
175	m	19	$9,46 \times 10^6$
179	w	36	$1,70 \times 10^7$
183	w	42	$2,10 \times 10^6$
185	m	45	$4,19 \times 10^6$
191	w	53	$1,38 \times 10^7$
193	m	22	$1,70 \times 10^5$
196	m	45	$8,87 \times 10^6$
200	m	19	$1,27 \times 10^7$

5.2 Verhinderung der Kontamination mit Fibroblasten

Um Keratinozyten in Reinkultur zu gewinnen, mussten die von Fibroblasten kontaminierten Zellkulturgefäße mit der Separationsmethode wie in Kap. 4.1.3 beschrieben behandelt werden. Einzelne Gruppierungen von Fibroblasten wie in Abbildung 9 abseits der Keratinozytenkultur konnten leicht mittels Zellschaber und unter Zuhilfenahme des Mikroskops entfernt werden, da die beiden Zellarten deutliche Unterschiede in ihrer Morphologie aufweisen. Starke Verunreinigung mit Fibroblasten (Abb. 10) und alle Bindegewebszellen, die den Bereich des Keratinozytenwachstums tangierten, konnten nur durch die Behandlung mit dem Komplexbildner Versene zunächst abgetötet und anschließend vorsichtig mit dem Zellschaber weitestgehend eliminiert werden. Ständige mikroskopische Kontrollen und ggf. erneute Anwendung der Methode führten hier zu sehr guten Ergebnissen.

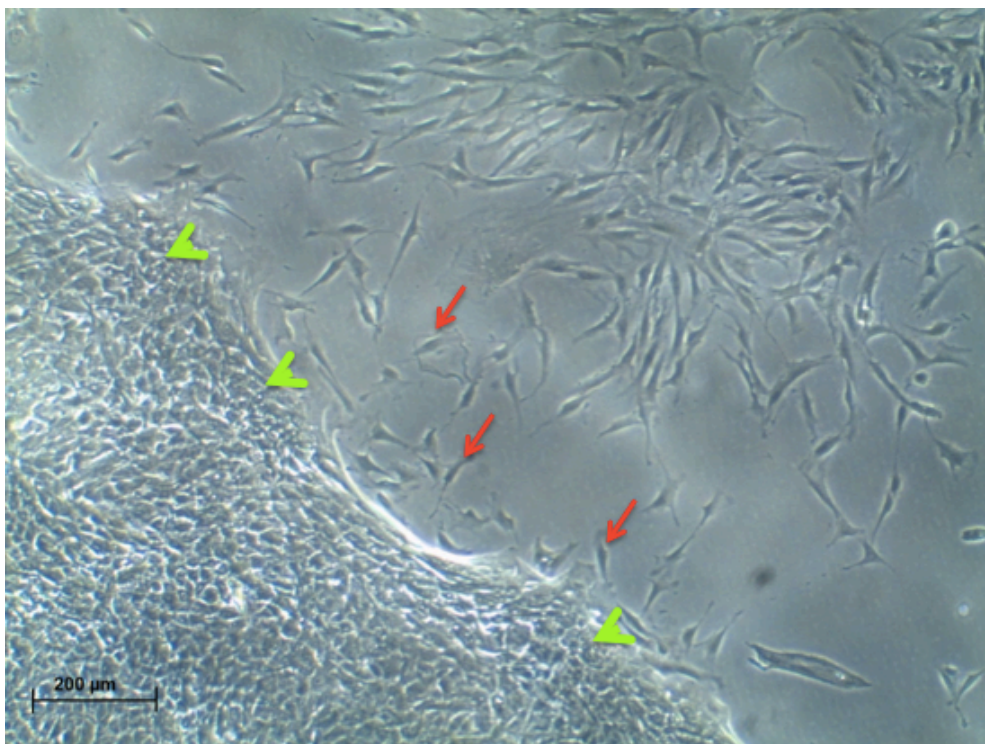


Abbildung 9:
Phasenkontrastaufnahme primärer Keratinozyten in D-MEM/Ham's-12 mit angrenzender Kontamination durch primäre Fibroblasten (leichter Befall, rote Pfeile). Die grünen Pfeile zeigen die Grenze der Keratinozyten.

Elimination durch Zellschaber möglich. Vergrößerung: 40x

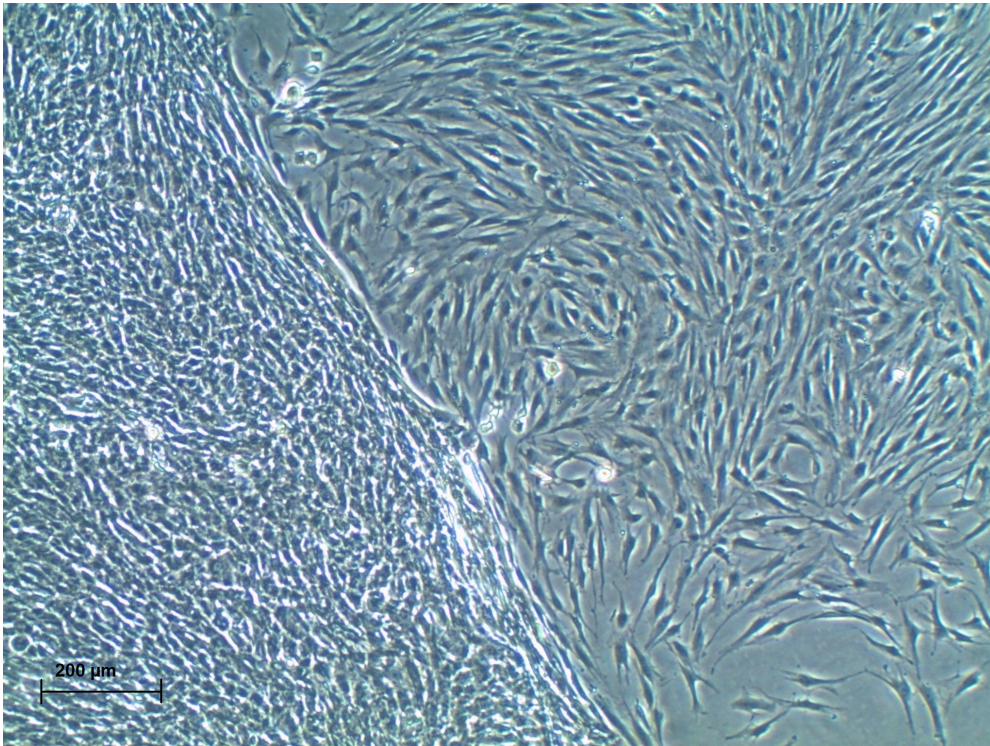


Abbildung 10:
Phasenkontrastaufnahme primärer Keratinozyten in D-MEM/Ham's-12 mit angrenzender Kontamination durch primäre Fibroblasten (starker Befall).
Elimination durch Behandlung mit Versene notwendig. Vergrößerung: 40 x

5.3 Anreicherung epidermaler Stammzellen

Durch die experimentellen Untersuchungen sollten die Bedingungen gefunden werden, die zur raschen Vermehrung von vitalen und mit einem hohen Proliferationspotential versehenen Keratinoblasten führen. Zum Vergleich wurden die Adhäsionsversuche mit Kollagen-IV- und Laminin-beschichteten Zellkulturgefäßen, sowie mit unbeschichteten Zellkulturgefäßen durchgeführt und sowohl die adhärenenten als auch die nicht-adhärenenten Zellen im Überstand nach der 20-minütigen Inkubationsphase in ein Zellkultursystem überführt. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Population von Keratinozyten. Die Dokumentation der Proliferationskinetik, d.h. die Quantifizierung der Zellproliferation und die Beurteilung der Zellaktivität erfolgte durch das Erstellen von Wachstumskurven mit Hilfe des CASY Cellcounters, durch den Nachweis der Zellvitalität mittels WST-1-Test und durch die Auswertung einer Real-Time-Zellanalyse (Impedanzmessung).

5.3.1 Wachstumskurve

Um die Entwicklung der Zellen nach der Durchführung des Adhäsionstest und Überführung in das Zellkultursystem beurteilen zu können, wurden die Keratinozyten im Abstand von 48 Stunden über 11 Tage hinweg untersucht und anhand der Anzahl der geernteten Zellen Wachstumskurven für jede Vergleichsbedingung (adhärierte und nicht-adhärierte Zellen nach Inkubation auf Kollagen-IV- und Laminin-beschichteten, bzw. unbeschichteten Zellkulturgefäßen) erstellt. Die mit Hilfe des CASY Cellcounters gezeichneten Kurven zeigen die charakteristischen Phasen (lag-Phase, log-Phase, stationäre Phase und Absterbephase) des Wachstums in vitro kultivierter Zellen auf. So konnte nach Beimpfung der Platten mit den isolierten Keratinozyten in allen Fällen die lag-Phase beobachtet werden, in der sich die Zellen zunächst an ihre neue Umgebung adaptierten und kaum an Anzahl zunahmen. Diese Anlaufphase beschränkte sich auf den Zeitraum zwischen Tag 1 (d1) und Tag 3 (d3) (siehe Abbildung 11), bevor die exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase) begann.

Nach der Messung an Tag 7 verlangsamte sich das Wachstum und wechselte in die stationäre Phase, in der sich die Geschwindigkeit der Zellvermehrung und das Absterben von Zellen angleichen.

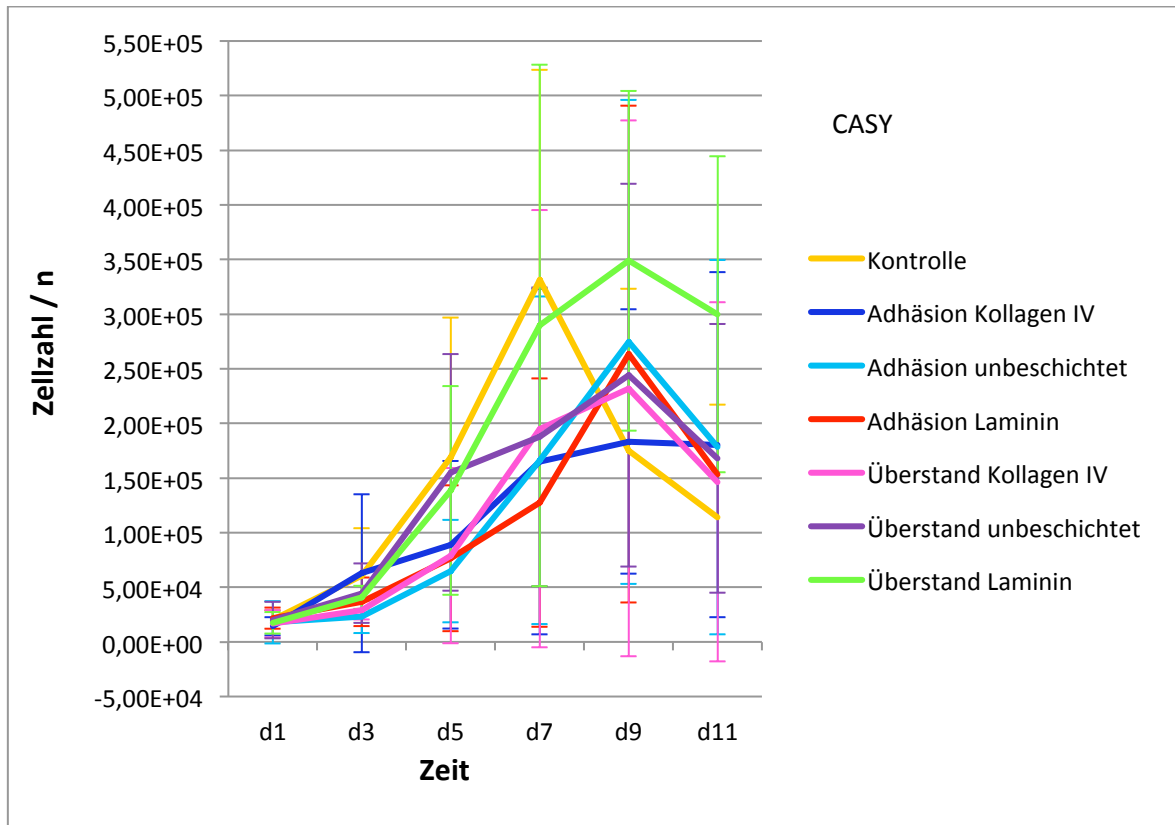


Abbildung 11: Wachstumskurven von Keratinozyten durch Zellzählung mittels CASY Zellzählgerät an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 nach Anwendung der Behandlungsmethode.

Während die Kontrollpopulation (gelb) bereits am 7. Tag ihr Maximum erlangte, benötigten die unter den verschiedenen Behandlungsmethoden wachsenden Zellen zwei Tage länger um den Peak zu erreichen (Tag 9). Anschließend fiel die Zellanzahl deutlich ab und es kam zum vollständigen Erliegen der Proliferation. Obwohl sich die dargestellten Zellzahlen an ihrem höchsten Punkt um bis zu $1,7 \times 10^5$ Zellen unterscheiden (Abbildung 12), ließ sich über die Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen.

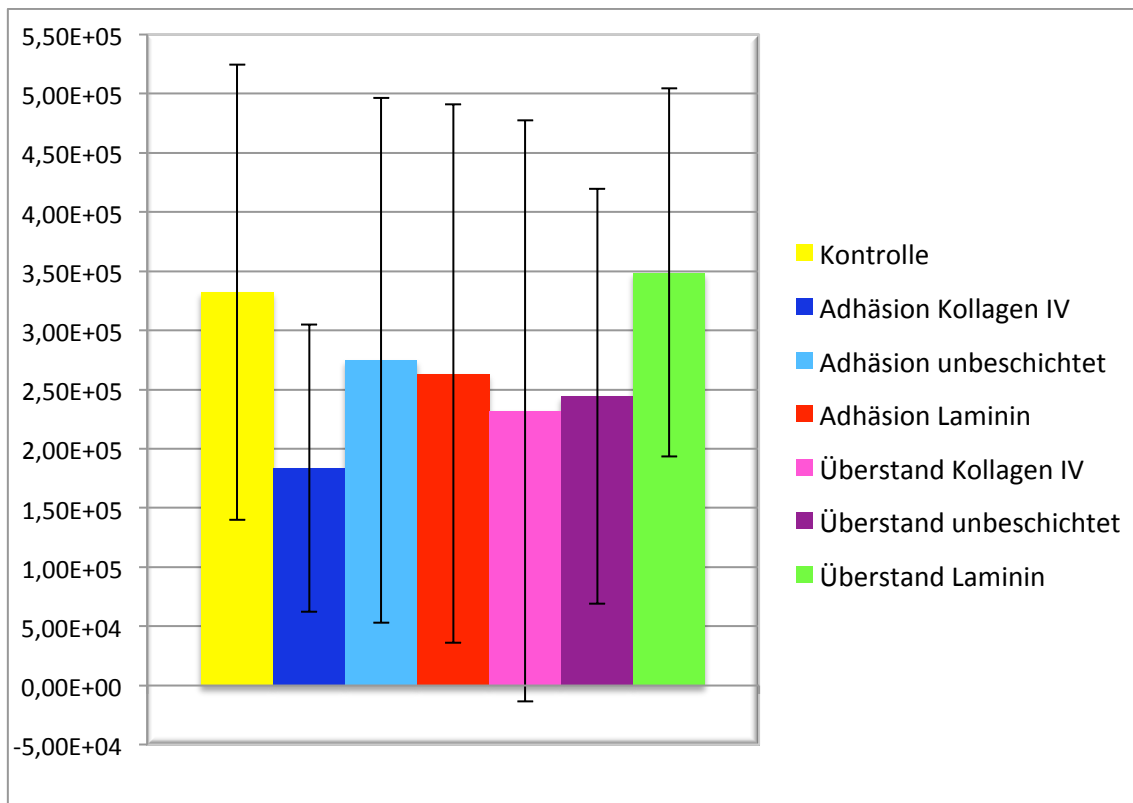


Abbildung 12:
Darstellung der maximal erreichten Anzahl von Keratinozyten während des 11-tägigen Kultivierungszeitraums nach Durchführung der Adhäsionsversuche im Vergleich

5.3.2 WST-1-Test

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Wachstumsphasen unter den verschiedenen Bedingungen auf eine variable Zellvitalität zurückzuführen sind, wurden die Keratinozyten zum Nachweis des Zellmetabolismus und der Zellintegrität mittels WST-1-Reagenz auf eine intakte Atmungskette getestet. Dieser Assay wurde nach 1, 3, 5, 7, 9 und 11 Tagen durchgeführt und stellt die metabolische Zellaktivität im Verlauf dar (Abbildung 13). Auch hier sind deutlich die verschiedenen Phasen wachsender Zellen (Anlaufphase, Log-Phase, stationäre Phase und Absterbephase) zu beobachten. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Allerdings besaßen die Werte dieser Methode eine geringere Streubreite als die Werte der mittels Zellzählgerät ermittelten Daten.

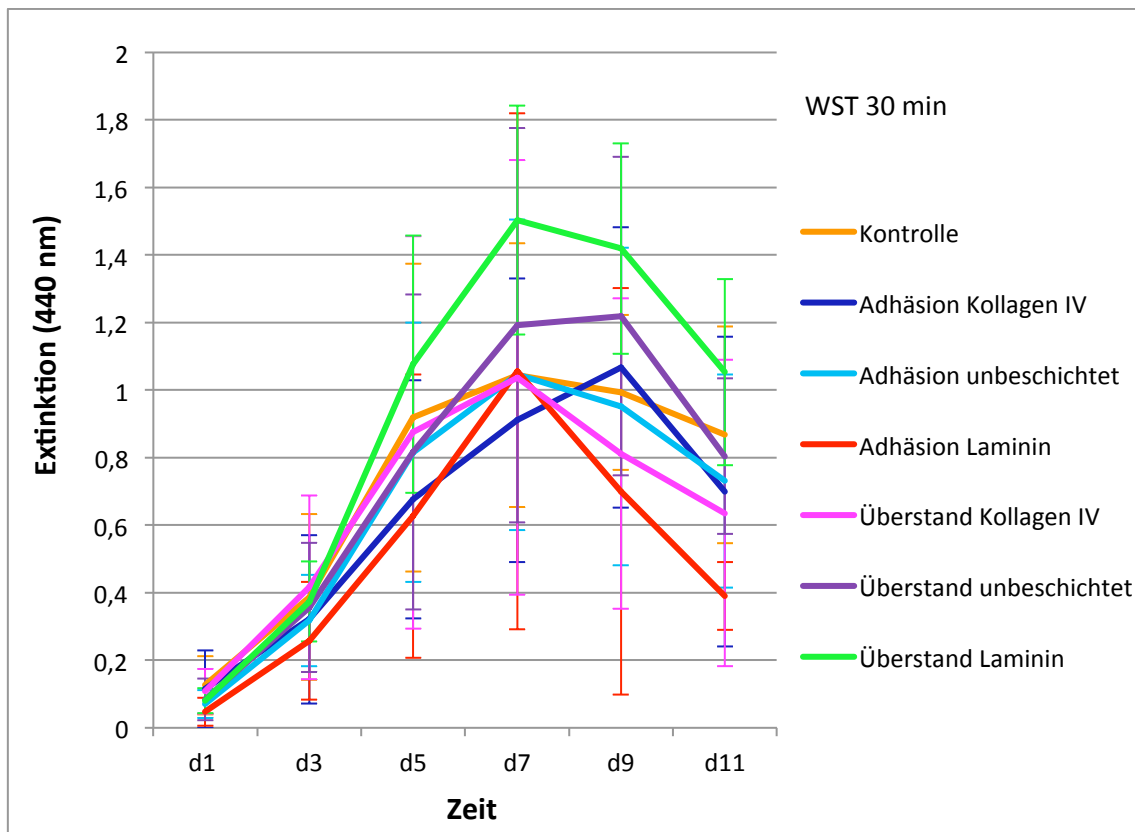


Abbildung 13:

Proliferationskinetik von Keratinozyten nach WST-1 Messung (nach 30 Minuten Inkubation mit dem WST-1 Reagenz) an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 nach Anwendung der Behandlungsmethode

Zur Bestätigung und Überprüfung der oben genannten Ergebnisse wurde der Test nach weiteren 30 Minuten erneut durchgeführt (Abbildung 14). Es konnten keine Abweichungen oder neuen Erkenntnisse festgestellt werden. Lediglich die Extinktionswerte hatten sich nach verlängerter Inkubationszeit wie erwartet nahezu gleichmäßig verdoppelt.

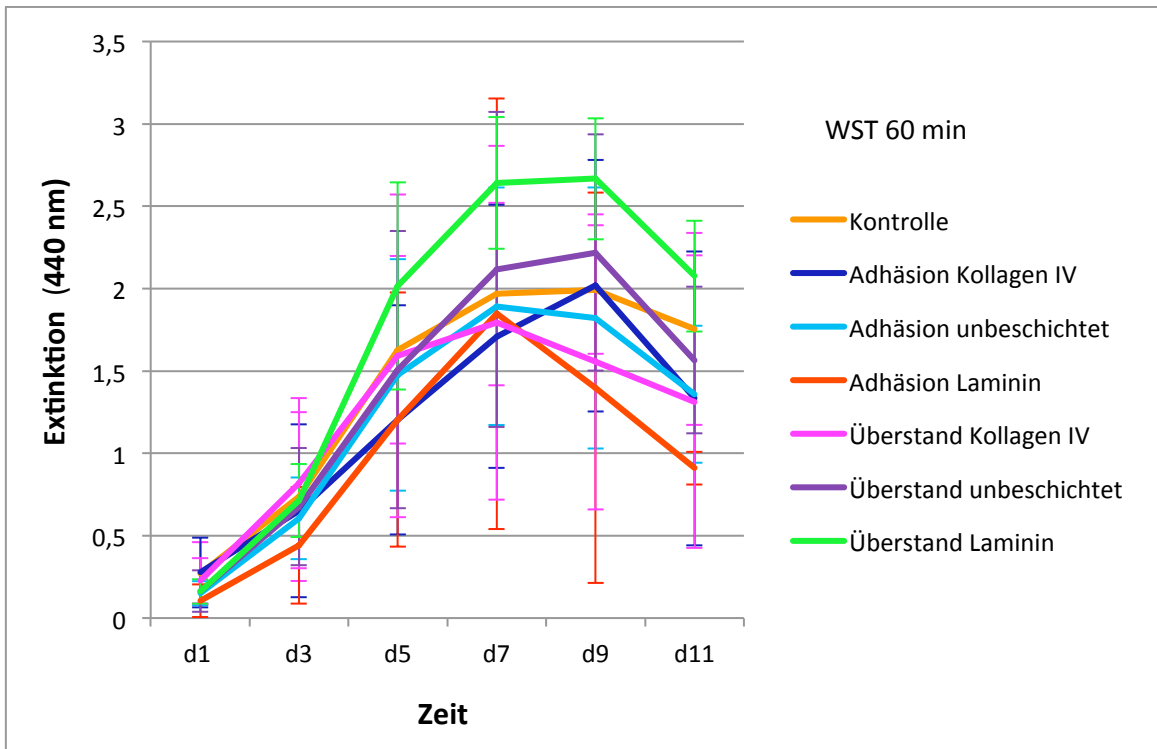


Abbildung 14:
 Proliferationskinetik von Keratinozyten nach WST-1 Messung (nach 60 Minuten Inkubation mit dem WST-1 Reagenz) an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 nach Anwendung der Behandlungsmethode

5.3.3 Real-Time-Zellanalyse

Die Real-Time-Zellanalyse ist aufgrund ihrer technischen Überlegenheit die konstanteste Messmethode der Versuchsreihe. Durch die fortlaufende Messung der Zellproliferation konnten die Veränderungen über die Zeit (Dauer der Untersuchung 113 Stunden) sehr detailliert dargestellt werden; die verschiedenen Wachstumsphasen sind deutlich zu erkennen (Abbildung 15a / Abbildung 15b mit Standardabweichung siehe Anhang). Während sich die aus den Überständen gewonnenen Zellen über den gesamten Zeitraum der Untersuchung stetig vermehrten (Abbildung 16), erreichten die adhärenierten Zellen bereits nach circa 17 Stunden ihr Wachstumsoptimum (Abbildung 17). Hier zeichnete sich nach einer steilen exponentiellen Wachstumsphase nach dem maximalen Peak eine schwankende, aber stetig abnehmende stationäre Phase ab. Die unbehandelte Kontrollgruppe verlief meist unterhalb der durch die Versuche geförderten Zelllinien und weist den charakteristischen Wachstumsverlauf in vitro kultivierter Zellen auf („Lag-Phase“, Anlaufphase, „Log-Phase“, stationäre Phase).

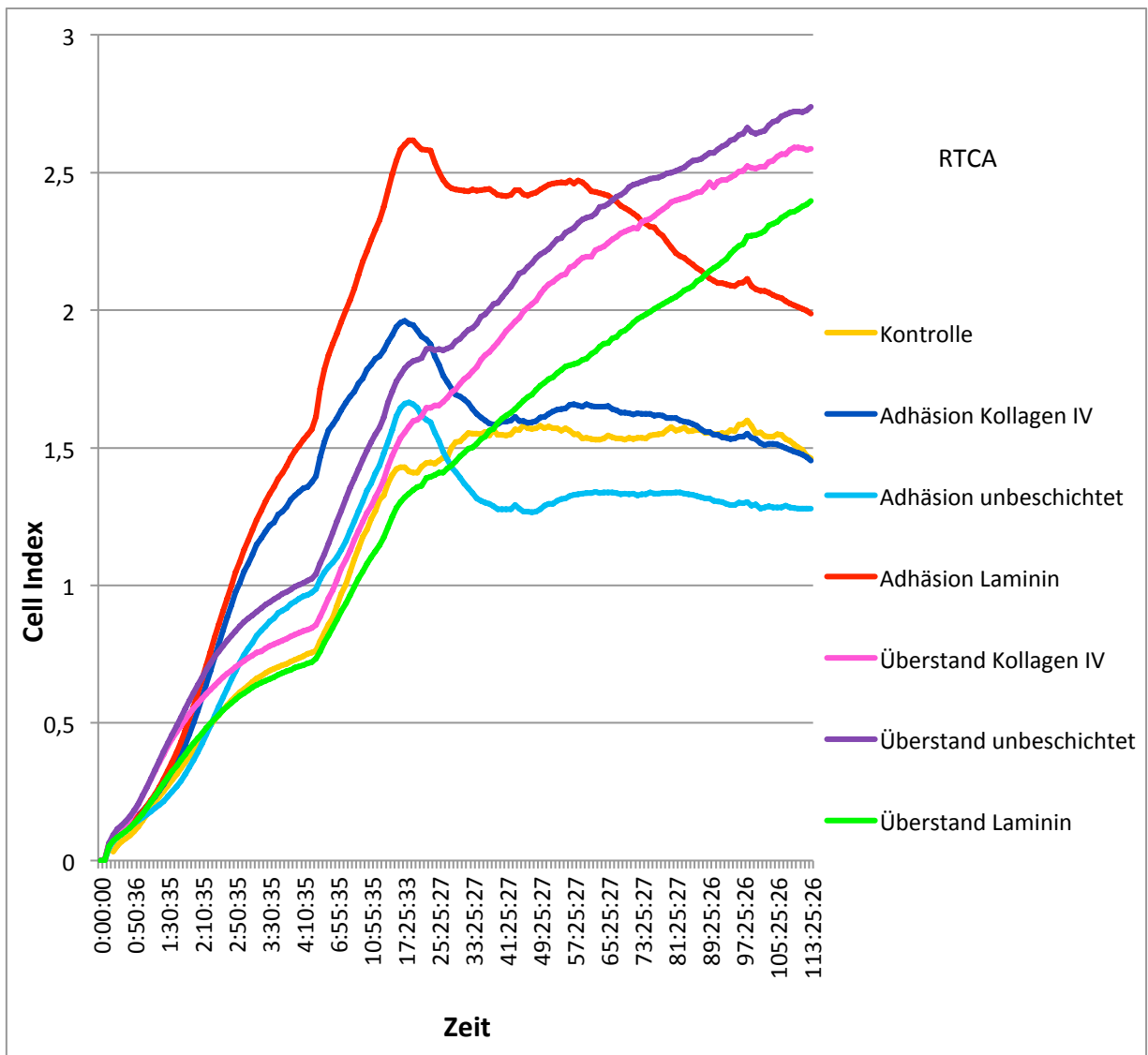


Abbildung 15a:
Darstellung des Wachstumsverhaltens von Keratinozyten mittels RTCA ermittelter Daten nach Anwendung der Behandlungsmethode über einen Zeitraum von mehr als 4 Tagen

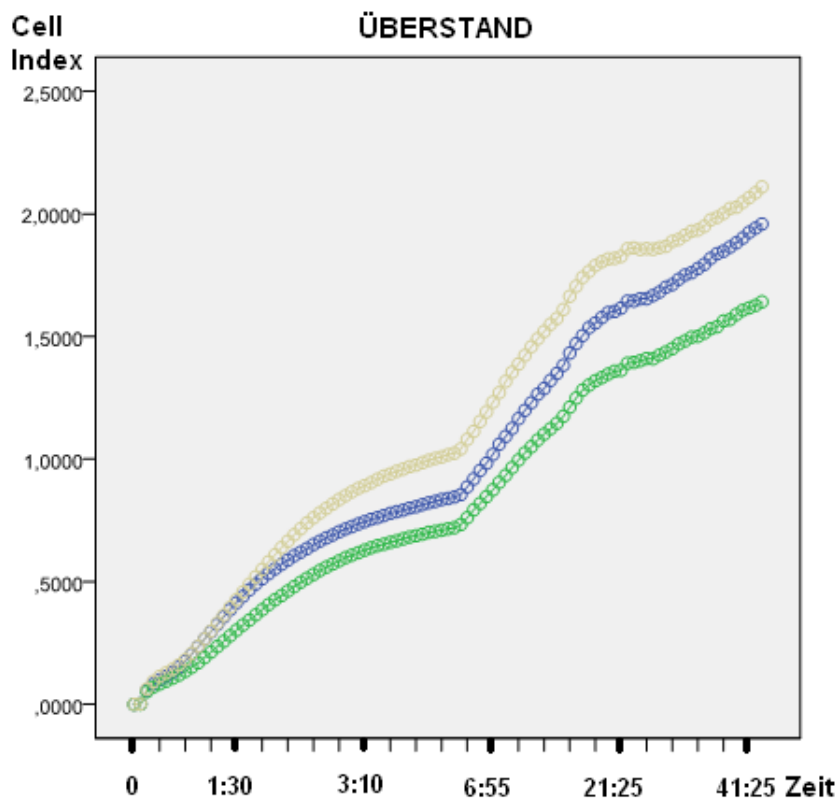


Abbildung 16:
Darstellung des Wachstums der nach der Behandlungsmethode im Überstand verbliebenen Zellen (Zeitraum bis 41 Stunden nach Beginn der Aussaat)

— Kollagen IV
— Laminin
— unbeschichtet

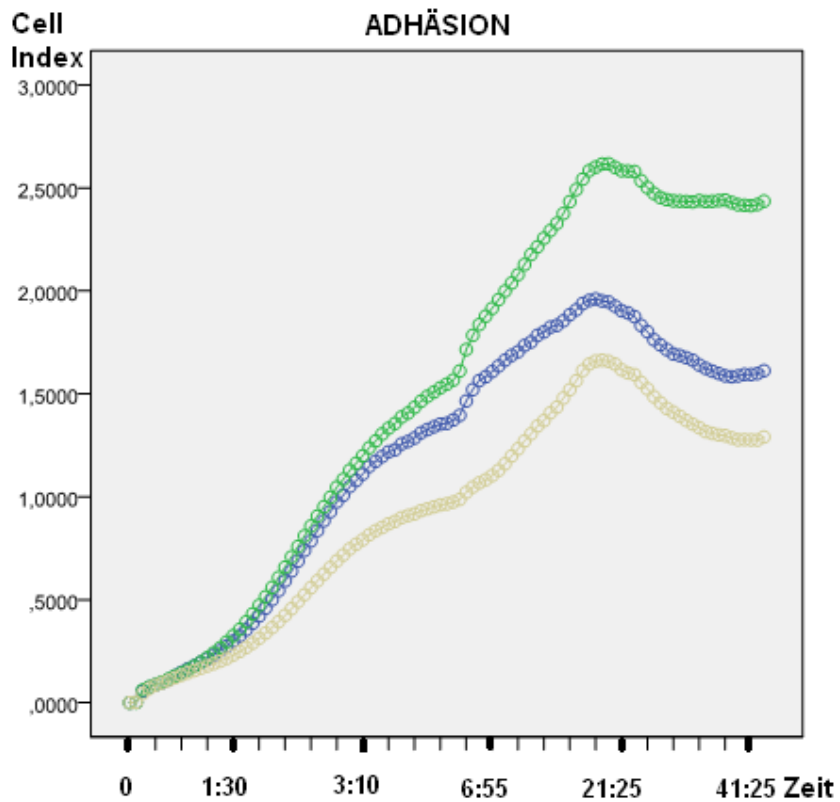


Abbildung 17:
Darstellung des Wachstums der nach der Behandlungsmethode adhärenen Zellen (Zeitraum bis 41 Stunden nach Beginn der Aussaat)

Auch hier konnte über die statistische Auswertung zwar eine Veränderung über die Zeit festgestellt werden, die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch nicht signifikant. Dennoch soll an dieser Stelle einmal der erwartete Verlauf anhand einer Einzelprobe dargestellt werden, um den Versuchsansatz zu verdeutlichen (Abb. 18).

Es zeigt sich, dass die an den verschiedenen Komponenten der EZM adhären Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase einen steileren Verlauf aufweisen und somit insgesamt über den Zeitraum der Kultivierung eine deutlich höhere Proliferationskinetik entwickeln als die Keratinozyten aus dem Überstand. Die Kontrolle (orange) läuft ohne erkennbare Vermehrung von Zellen mit. Die höchste Ausbeute erlangte der Versuchsansatz, bei dem die Zellen auf mit Kollagen-IV-beschichteten Zellkulturgefäßen adhären (blau). Nachfolgend bildeten die Zellen nach Behandlung mit Laminin (rot) oder an unbeschichteten Platten haftende Keratinozyten (türkis) die größten Populationen. Deutlich flacher zeigte sich der Kurvenverlauf der im Überstand befindlichen Zellen, absteigend Überstand Kollagen-IV (rosa), unbeschichtet (lila) und Laminin (grün).

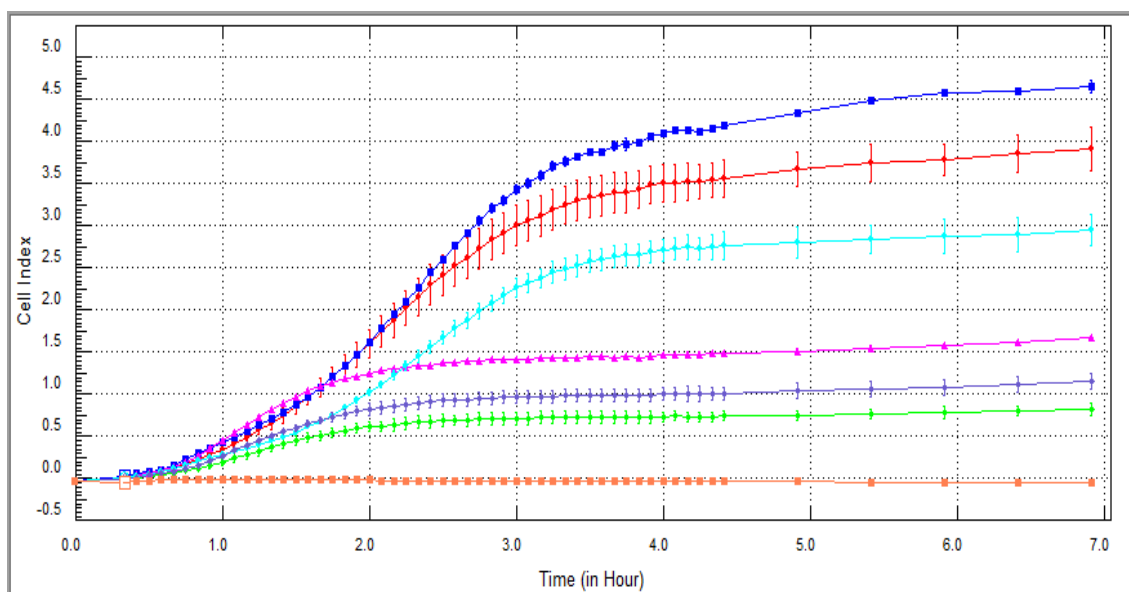


Abbildung 18:

Darstellung des erwarteten Verlaufs nach Durchführung der Behandlungsmethode und Auswertung der mittels RTCA ermittelten Daten (Probe 191, Laufzeit 6:25:35, RTCA Software)

6 Diskussion

Die Erhaltung der Integrität des Körpers ist eine der wichtigsten Schutzbarrieren gegenüber äußeren Umwelteinflüssen. Sowohl bei physikalischen als auch bei chemischen Faktoren spielt die Abgrenzung durch die Haut eine herausragende Rolle. Auch Defekte im Bereich der oralen Schleimhaut infolge von Traumata, angeborenen oder erworbenen Krankheiten können die ungestörte Funktionsweise in Bezug auf Atmung, Nahrungsaufnahme und Sprache des menschlichen Organismus empfindlich beeinträchtigen. Somit gilt auch in diesem Bereich das Erreichen einer weitestgehenden Regeneration nach einer Schädigung als erklärtes Ziel der medizinischen Wissenschaft. Da eine Wiederherstellung, d.h. ein adäquater Wundverschluss welcher alle Funktionen wieder ermöglicht, mit dem limitierten Eigengewebe oft nicht ideal gelingt, bietet das Tissue Engineering, also die Herstellung biologisch kompatibler und funktioneller Transplantate aus primären autologen Zellen, eine aussichtsreiche Alternative. Die Entwicklung dieser Hautäquivalente erfordert zunächst den Gewinn von Erkenntnissen über die benötigten Bestandteile im Detail und lenkt die Forschung somit initial auf den Bereich der Zellbiologie und ihre molekularen Grundlagen. Insbesondere die Untersuchung der Keratinozyten, die neben den Fibroblasten einen der beiden Hauptzelltypen des Gewebes darstellen [57], nimmt hierbei einen bedeutenden Stellenwert ein. Als einer der ersten Schritte gilt es Zellmaterial über Mundschleimhautproben pathologisch gesunder Patienten zu generieren und aus einer geringen Anzahl Keratinozyten ausreichend einsetzbare Zellen zu züchten. Dass hierbei Stammzellen von besonderem Interesse sind, erklärt sich durch ihre besondere Eigenschaft des erhöhten Proliferationspotenzials. Eine Steigerung des gesamten Ertrages bei der Kultivierung primär humaner Keratinozyten durch Anreicherung der hauptsächlich dafür verantwortlichen Zellen, den epidermalen Stammzellen, war Ziel dieser Arbeit. Doch obwohl diese Stammzellen eine Schlüsselrolle in Hinblick auf die Homöostase und die Wundheilung des Gewebes haben, bleiben sie schwer zu identifizieren und zu charakterisieren [21]. Neben

verschiedenen Methoden, wie z.B. der Separation von Stammzellpopulationen durch Magnet-Technik (MACS) [21], der durch Gravität unterstützten Zellsortierung [58], der Identifikation durch die Expression von p75 Neutrophin-Rezeptoren [59] oder der Isolation der Stammzellen durch Marker wie β 1-Integrin [60], sollte hier ein Verfahren entwickelt werden, das weitestgehend frei von erhöhtem Geräteaufwand und Zugabe von teuren Zusätzen eine Anreicherung von Keratinozyten ermöglicht und zudem für die klinische Anwendung im Zuge des Tissue Engineerings eine schnellstmögliche Verfügbarkeit gewährleistet.

Insbesondere die Verknüpfung der Methoden, also der Markierung des β 1-Integrin zur Vorselektion epidermaler Stammzellen und die darauffolgende Anreicherung der mit erhöhtem Proliferationspotenzial ausgestatteten Zellen, könnte die Konstruktion eines Gewebeäquivalents beschleunigen bzw. durch die verbesserte Verfügbarkeit der Keratinozyten die weitere Forschung im Bereich des Tissue Engineerings unterstützend voranbringen.

6.1 Explantation und Isolation humaner oraler Keratinozyten

Die Isolation humaner oraler Keratinozyten für ein Zellkultursystem stellte in der Vergangenheit immer wieder eine Herausforderung dar. Um autologe Zellen der Patienten zu generieren, wurden bei Routineeingriffen wie Extraktion oder Metallentfernung nach Kieferbruch kleine Mundschleimhautstücke an geeigneten Stellen entnommen. Die Größe dieser Stücke wurde auf ein Maß von 0,3 – 0,6 cm² festgelegt, um den freiwilligen Spendern keine zusätzlichen Komplikationen bei der Wundheilung zu verursachen. Zwar konnte trotz der geringen Größe der entnommenen Proben die angestrebte Zellenzahl von 1×10^6 Zellen nach der Primärkultivierung erreicht werden, allerdings ist anzunehmen dass dieser limitierende Faktor die Eindeutigkeit der Ergebnisse beeinflusste und der Erfolg der Messungen hinter den Erwartungen zurückblieb. Die Größe der MSH-Stücke variiert in verschiedenen Studien erheblich, liegt aber meist über der hier verwendeten

möglichen Probenausdehnung. So verwendeten zum Beispiel Izumi et al. 0,4 – 5 cm² [61] große Mundschleimhautstücke für die Primärkultivierung und erreichten damit eine Ausbeute von bis zu 7 x 10⁶ Zellen/cm². Arenholt-Bindslev et al. nutzten Biopsien einer Größe von 1,0 cm² für die Explantation [62]. Bei der Transplantation (engl. Autografting) von kultiviertem Gingivaepithel durch Lauer et al. wurden 0,4 – 1,2 cm² Proben verwendet [63-65]. Lediglich die von Chinnathambi et al. verwendeten Mundschleimhautproben fallen mit einer Fläche von 0,2 x 0,4 cm² unter die Größe von den bei dieser Arbeit explantierten Gewebestücken [57]. Der Explantat-Methodik (angelehnt an Tomakidi et al. 1997 [34]) zur Isolation der Keratinozyten steht die Einzelzellsuspensionstechnik gegenüber, bei der die Biopsie mittels 0,25 % Trypsin-EDTA in Medium ohne Ca²⁺ für 3 mal 20 Minuten in Einzelzellen aufgelöst wird [66]. Die Explantat-Technik liegt mit ihrer Erfolgsquote mehr als 20 % über der enzymatischen Methode [67] und wurde daher für das Herauslösen der Zellen aus der Mundschleimhautprobe verwendet. Die durchschnittlich erreichte Zellenanzahl von 3,6 x 10⁶ war ausreichend für die nachfolgende Passagierung. Alter und Geschlecht der Probanden hatten auch hier wie in der Literatur bereits beschrieben keine Auswirkung auf die Erfolgsrate bei der Kultivierung von oralen Keratinozyten [67].

6.2 Verhinderung der Kontamination mit Fibroblasten

Da es trotz sauberer Trennung der Mundschleimhautprobe in Epidermis und Dermis gelegentlich zur Kontamination der Primärkulturen mit Fibroblasten kam, musste das Überwachsen der Keratinozyten-Kultur durch diese Bindegewebszellen unterbunden werden, da das Separieren der beiden Zelltypen schwierig wird, sobald sich diese aneinander lagern [68]. Durch den Einsatz von Versene, einem EDTA-basierendem Komplexbildner, oder durch das mechanische Abschaben der unerwünschten Zellen, konnten Keratinozyten in Reinkultur erhalten werden. Sowohl die chemische, als auch die mechanische Vorgehensweise bewährte sich im Verlauf der Untersuchungen als probate Separationsmethode der beiden Zelltypen, wobei das mechanische Entfernen

der Fibroblasten, wenn möglich, einer zusätzlichen chemischen Belastung der Keratinozyten durch Versene vorzuziehen ist.

6.3 Anreicherung epidermaler Stammzellen

Während die von Rheinwald und Green (1975) [69] etablierte Methode zur Kultivierung von Keratinozyten noch auf die Verwendung von xenogenen murinen 3T3 Feeder-Zellen zurückgriff und hiermit erstmals überhaupt eine erfolgreiche Subkultivierung der Zellen gelang [70], folgten 1987 die ersten Feeder-zellfreien Kulturmethode durch Southgate et al. [71] und Arenholt-Bindslev et al. [62]. Diese Feeder-zellfreien Methoden verhindern im Gegensatz zur Feeder-Zell-Methode die Kontamination der anschließend hergestellten Hautäquivalente mit Fremdproteinen oder die Transfektion mit xenogener DNA [72], sodass das potentielle Risiko einer dadurch verursachten immunogenen Abstoßungsreaktion des Transplantates ausgeschlossen werden kann [66]. Zudem erreichen die Zellen einen ausreichenden Differenzierungsgrad [73], was für die Einbindung der Keratinozyten bei der Herstellung eines Mukosa-Substituts wünschenswert ist [63]. Beide Methoden werden nach wie vor angewendet [74], allerdings ersetzt die Verwendung spezieller Medien für Keratinozyten weitestgehend die ältere Technik [75, 76], so wie das bei dieser Arbeit verwendete KGM-Medium (Promocell) [77], welches durch die Anreicherung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren die Passagierung der Zellen über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Zudem versprechen in der Literatur beschriebene Methoden ein gutes Keratinozytenwachstum durch beschichtete Kulturschalen; insbesondere Proteine der Extrazellulären Matrix (verschiedene Kollagene, Fibronectin, Laminin) kommen hierbei zum Einsatz [34, 62, 70, 78].

Die Kombination dieser Methoden ist ein bewährtes Mittel für die erfolgreiche Kultivierung humaner Keratinozyten. Darum wird sie in dieser Arbeit angewendet und durch die Auswahl der ECM-Komponenten eine zusätzliche Fokussierung auf die

epidermalen Stammzellen gelegt, die durch ihr verstärktes Proliferationsverhalten entscheidend zum raschen Gewinn von Keratinozyten beitragen sollen.

Sowohl die ECM-Komponente Kollagen-IV als auch das verwendete Laminin haben eine besondere Affinität zum Adhäsionsprotein Integrin, welches eine fundamentale Rolle bei der Verknüpfung von Basalzellen mit Molekülen der extrazellulären Matrix spielt [79]. Insbesondere bei Epithelien ist die β 1-Untereinheit des Integrins als wichtiger Marker anerkannt und wird häufig bei Versuchen zur Identifikation von epidermalen Stammzellen verwendet [80]. Watt et al. zeigten, dass hauptsächlich die Expression von β 1-Integrinen mit den 2-, 3-, und 5-Untereinheiten für die stärkere Haftung an der Basalmembran verantwortlich ist und die Bindung an Kollagen-IV und Laminin die terminale Differenzierung inhibiert [22, 81]. Somit verbleiben die Keratinozyten in dem Stadium einer Stammzelle, deren Eigenschaft der erhöhten Teilungsrate für die Kultivierung genutzt werden kann. Zur Isolation dieser mit einem erhöhten Proliferationspotenzial ausgestatteten Keratinozyten wurden in dieser Arbeit die aus Explantaten erhaltenen Keratinozyten für 20 Minuten auf mit ECM-Komponenten Kollagen-IV- oder Laminin-beschichteten Zellkulturgefäßen ausgesät und sowohl die nicht adhären als auch die adhären Zellen in getrennten Zellkultursystem kultiviert. Der erhöhte β 1-Integrin-Level der epidermalen Stammzellen wurde somit indirekt als Marker verwendet.

Durch die Verwendung der extrazellulären Matrixproteine (Laminin und Kollagen-IV) und ihre Wechselwirkung mit den entsprechenden Rezeptoren der Keratinozyten könnte es neben dem Verbleiben im Stammzellstadium auch zu einer Kontaktinhibition [82] der Zellen kommen. Dies könnte eine Erklärung für die Schwankungsbreite der Werte im Versuchsaufbau erklären. Insbesondere die Mundschleimhautzellen mit einem hohen Gehalt an Integrin finden im Versuchsaufbau alle benötigten Moleküle für den Halt über fokale Kontakte und der so entstandene enge Zellverbund könnte suggerieren, dass keine Notwendigkeit zur Zellvermehrung besteht. Die Teilungsrate

verlangsamt sich dann, auch wenn ein erhöhtes Proliferationspotenzial durch die selektierten Zellen mit Stammzelleigenschaften gegeben wäre.

- Beurteilung der Zellproliferation und Zellaktivität

Durch die Auftrennung in ECM-Komponenten-affine Keratinozyten und nicht-adhärenente Zellen, sollte bei der nachfolgenden Kultivierung gezeigt werden, dass die affinen Keratinozyten durch ihre Stammzelleigenschaften eine erhöhte Proliferation aufweisen. Hier wäre eine Analyse des tatsächlichen β 1-Integrin-Levels der verschiedenen Populationen mittels Immunfluoreszenz-Methode (Izumi et al. 2007 [83]) sinnvoll, um vor der aufwendigen Kultivierung eine Vorsortierung geeigneter und weniger geeigneter Zellen zu erreichen. Eventuell könnte eine Kombination aus der Adhäsionsmethode und der Immunfluoreszenz-Analyse teure Techniken wie die magnetische Separation ersetzen [84] und die Gewinnung oraler Keratinozyten mit einem hohen proliferativen Potential vereinfachen. In jedem Fall ist anzunehmen, dass die Forschung im Bereich des oralen Tissue Engineerings und die damit verbundene mögliche Defektdeckung durch autologe Transplantate rasch voranschreitet, auch weil die Zellen der Mundschleimhaut trotz ähnlicher Morphologie ein signifikant schnelleres Wachstum in vitro aufweisen als die Keratinozyten der äußeren Haut [85].

Um Zellproliferation und Zellaktivität während der Kultivierung zu beurteilen, wurden drei verschiedene Methoden angewendet. Die unterschiedliche Proliferationskinetik der Keratinozyten in Bezug auf die durchgeführten Versuche konnte dadurch über einen Zeitraum von bis zu elf Tagen verfolgt werden; darüber hinaus empfahl sich jede Methode zur Quantifizierung als besser oder schlechter geeignetes Mittel zur Dokumentation des Wachstumsverhalten.

6.3.1 Wachstumskurve

Die Konzentrationsbestimmung der geernteten Zellen in Suspension erfolgte mit dem CASY Cellcounter (Schärfe Systeme, Reutlingen). Das Bestimmungsverfahren beruht auf einer Kombination aus den Prinzipien der Widerstandsmessung und der

Pulsflächenanalyse zur Signalauswertung. Lebende Zellen mit intakter Membran fungieren dabei als Isolatoren und die von ihnen ausgelöste Widerstandsänderung spiegelt die Anzahl der Keratinozyten wider. Da für die Zellzählung die kultivierten Zellen aus ihren Zellkulturgefäßen abgeerntet werden müssen und diese Prozedur wie in Kap. 4.2.1 beschrieben nur in mehreren Schritten mit Zugabe von Enzymen möglich ist, zeigt diese Methode die größte Anfälligkeit für Fehler. Insbesondere die Zugabe des Enzyms Trypsin und seine Auswirkungen auf die für die Zellzählung benötigten lebenden Zellen und ihre intakten Zellmembranen spielen dabei eine bedeutende Rolle. Zwar wurde die Ablösung der Zellen aus dem Zellkulturgefäß mit Hilfe von Trypsin durch genaue Zeitmessung der Inkubationszeit überwacht, dennoch ist nicht abzuschätzen in welchem Maße die Hydrolyse von Peptidbindungen durch das Enzym die Integrität der Zellen beeinflusst.

Die mit Hilfe des CASY Cellcounters erstellten Wachstumskurven entsprechen dem charakteristischen Verlauf *in vitro* kultivierter Zellen. Während die Kontrollpopulation das stärkste Wachstum aufweist, bleiben die bei den Adhäsionsversuchen beimpften Keratinozyten nahezu gleichbleibend auf einem Level. Da diese Zellen einer höheren Belastung durch die erprobten Methoden ausgesetzt und zusätzliche verdauende Enzymbehandlungen bei den Messungen notwendig wurden, waren hier keine signifikanten Unterschiede zwischen adhären und nicht-adhären Zellen zu erkennen. Grundsätzlich kann aber nicht festgestellt werden, ob die Messungen der Quantität durch Zellfragmente und Schäden der Membranintegrität beeinflusst wurden oder ob das Proliferationspotenzial der Keratinozyten durch die Adhäsionsversuche nicht gesteigert werden konnte.

6.3.2 WST-1-Test

Zum Nachweis der Zellvitalität wurden die Keratinozyten mittels WST-1-Reagenz auf eine intakte Atmungskette getestet. Dieser Assay stellt die metabolische Zellaktivität im Verlauf dar und auch hier sind deutlich die verschiedenen Phasen wachsender

Zellen (Anlaufphase, Log-Phase, stationäre Phase und Absterbephase) zu beobachten. Obwohl auch diese Methode keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen aufwies, zeigten die Daten eine geringere Streubreite als die mittels Zellzählgerät ermittelten Werte. Möglicherweise ist auch hier die Belastung der Zellen durch die angewandten Methoden über die Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix zu groß, als dass ein gesteigertes Proliferationspotenzial den Verlust intakter Zellen ausgleichen bzw. übersteigen könnte. Allerdings erweist sich der WST-1-Test generell als geeignetere Methode zur Quantifizierung und Überprüfung der Viabilität der Keratinozyten als die Zellzählung durch den CASY Cellcounter, da die Messung direkter und mit weniger fehleranfälligen Zwischenschritten möglich ist.

6.3.3 Real-Time-Zellanalyse

Die Verwendung der Real-Time-Zellanalyse (xCELLigence System von Roche Applied Science) ließ eine ständige Beobachtung der Auswertung der Versuchsreihe zu. Die Anzahl der Keratinozyten konnte mittels Impedanzmessung direkt und ohne aufwendiges Ablösen der Zellen aus den Kulturschalen ermittelt werden; somit erweist sich diese Methode gegenüber der Zellzählung mittels Zellzählgeräts und dem WST-1-Tests am exaktesten, da kein durch verdauende Zwischenschritte entstandener Zelldetritus das Zählergebnis verfälschen kann. Bei dieser non-invasiven Methode kann sowohl auf die mechanische Irritation und die Interaktion mit Zusatzstoffen (Zugabe des WST-1-Assays) verzichtet werden, jedoch ist die Anschaffung des Geräts vergleichsweise teuer. Die Quantifizierung der Zellproliferation und Vitalität in Echtzeit stellt gegenüber den Methoden mit Endpunkt-Messung einen weiteren Vorteil dar, da sich die Ergebnisse der Zählungen direkt auf die vorangegangenen Messungen beziehen und die Wachstumskurve den Verlauf einer bestimmten Zellpopulation widerspiegelt. Die über den Zeitraum von mehreren Stunden gemessenen Daten ließen keine eindeutige Verbesserung der Proliferationskinetik erkennen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen sind zu gering, um daraus einen tatsächlichen Nutzen für die rasche Gewinnung von Keratinozyten für die Herstellung

eines Gewebeäquivalents abzuleiten. Zwar zeigten die Zellen, die bei den Adhäsionsversuchen haftend geblieben waren, zunächst ein deutlich stärkeres Wachstum gegenüber den Zellen aus dem Überstand, indes bestand dieser Einfluss der angewandten Methode nur als Veränderung über die Zeit und wirkte sich nicht auf die generelle Ausbeute der im Zellkultursystem gezüchteten Zellen aus. Dass die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten durch die Anreicherung von epidermalen Stammzellen durch Adhäsion auf extrazellulären Matrixproteinen gesteigert werden kann, zeigt die in Abbildung 18 dargestellte Probe 191. Eine Vorselektion von Zellen mit Stammzeleigenschaften ist jedoch durch die oben genannten Methoden, wie der Separation von Stammzellpopulationen durch Magnet-Technik (MACS) [23], der durch Gravität unterstützten Zellsortierung [58], der Identifikation durch die Expression von p75 Neutrophin-Rezeptoren [59] oder der Isolation der Stammzellen durch Marker wie β 1-Integrin [60] für eindeutigere Ergebnisse unerlässlich. Damit bleibt die Anreicherung von Keratinozyten und deren schnellstmögliche Verfügbarkeit für die klinische Anwendung im Bereich des Tissue Engineerings weiterhin mit einem erhöhten Geräteaufwand und teuren Zusätzen verbunden.

7 Zusammenfassung

Da Defekte im Bereich der oralen Schleimhaut infolge von Traumata, angeborenen sowie erworbenen Krankheiten die ungestörte Funktionsweise in Bezug auf Atmung, Nahrungsaufnahme und Sprache des Menschen empfindlich beeinträchtigen und ein adäquater, alle Funktionen wiederherstellender Wundverschluss mit dem limitierten Eigengewebe oft nicht möglich ist, bietet das Tissue Engineering durch die Entwicklung eines Hautäquivalents eine aussichtsreiche Alternative. Um eine ausreichende Menge an Zellen für die Herstellung eines autologen Transplantates in kurzer Zeit zur Verfügung zu stellen, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Steigerung der Proliferationsfähigkeit primärer humaner Keratinozyten aus oraler Mukosa im Zellkultursystem etabliert werden. Dazu mussten zunächst über die Explantation von Gewebeproben gesunder Patienten orale Schleimhautzellen gewonnen und die primären Keratinozyten von den mitwachsenden Fibroblasten isoliert werden. Dies wurde durch chemische und mechanische Separationsmethoden erreicht. Die Kultivierung der exprimierten Zellen erfolgte unter ständiger Beobachtung und physiologischen Bedingungen über einen Zeitraum von mehreren Wochen. Nach Konfluenz der zweiten Passage wurden die Zellen geerntet und für die Versuche vorbereitet. Die Steigerung der Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten sollte durch die Anreicherung epidermaler Stammzellen erreicht werden, da diese insbesondere durch ihre Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung die Grundlage für die Regeneration, Differenzierung und Homöostase des Gewebes bilden. Eine Möglichkeit zur Isolation von Zellen mit Stammzeleigenschaften stellt die Adhäsion an beschichteten Zellkulturgefäßen dar. Die Affinität des hauptsächlich in Stammzellen vorkommenden β 1-Integrin-Rezeptors zu Bestandteilen der Basalmembran wie Kollagen-IV und Laminin sollte die Trennung hoch proliferativer Zellen von weniger teilungsaktiven Zellen leisten und das Protein indirekt als Marker für die Stammzellen fungieren. Über die Adhäsion der Keratinozyten an mit den Komponenten Kollagen-IV und Laminin beschichteten Gefäßen ließen sich zwei Zellpopulationen (adhärente und nicht-

adhärente Zellen) gewinnen. Unabhängig von der verwendeten Adhäsionskomponente zeigten die Fraktionen den charakteristischen Wachstumsverlauf (lag-Phase, log-Phase, stationäre Phase und Absterbephase) *in vitro* kultivierter Zellen, allerdings konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Vitalität und die Proliferationskinetik der Keratinozyten festgestellt werden. Eine nach der geleisteten Auftrennung der Keratinozyten zwischengeschaltete Analyse und Identifikation von Stammzellen mittels β 1-Integrin-Marker (z.B. durch einen Immunfluoreszenztest) könnte klären ob die adhärente Population überhaupt einen erhöhten Anteil an hoch proliferativen Keratinozyten beinhaltet oder ob die zahlreichen notwendigen, aber für die Zellen belastenden, Zwischenschritte der hier angewendeten indirekten Methode auslösend für die geringen Unterschiede sind. In Anlehnung an die von Stein et al. erarbeiteten guten Ergebnisse bezüglich der Proliferationskapazität oraler Keratinozyten nach Adhäsion an Kollagen-IV-beschichteten Zellkulturgefäßen wurde bei der vorliegenden Arbeit auf die aufwändige immunhistochemische Untersuchung verzichtet. Ein verstärktes Wachstum der adhären Population konnte nur bei vereinzelten Proben festgestellt werden; insgesamt konnte die prioritär gewünschte Steigerung der Proliferation primärer humaner Keratinozyten im Zellkultursystem zur raschen Bereitstellung von Zellen für die Entwicklung eines autologen Mundschleimhaut-Transplantates nicht erreicht werden. Die drei angewandten Verfahren zur Erfassung der Quantität führten hinsichtlich der Wachstumssteigerung zu ähnlichen Ergebnissen. Da sie aber zum einen durch das Wegfallen der für die Zellzählung und den WST-1-Test notwendigen Zwischenschritte eine non-invasive (ohne mechanische Irritation und Interaktion mit Zusatzstoffen), d.h. für die Zellen schonende Methode darstellt und sich zum anderen die Ergebnisse der Real-Time-Zellanalyse, im Gegensatz zur Endpunkt-Messung, direkt auf die vorangegangenen Messungen beziehen, überzeugte die Auswertung mittels Impedanzmessung in Genauigkeit und Darstellung der Veränderung des Zellwachstums über die Zeit.

8 Literatur

1. **Reinke, J.M., Sorg, H. 2012.** Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43.
2. **Mertsching, H., Kaufmann, M., Saxler, J., Gehrman, A.-L. 2009.** Haut aus der Maschine. *labor&more*, 4: p. 6-8.
3. **Lotmar, R. 1964.** Bestimmung der Pufferkapazität der menschlichen Haut mittels potentiometrischer Titration. *Archives of Dermatological Research*, 218 (3): 244-253. Springer.
4. **Bibliographisches Institut GmbH Mannheim, 2011.**
<http://www.duden.de/node/773546/revisions/1156867/view>
5. **Watt, F. M. 1998.** Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1370), 831-837.
6. **Weinstein, G.D., McCullough, J.L., Ross, P. 1984.** Cell proliferation in normal epidermis. *Journal of investigative dermatology*, 82(6), 623-628.
7. **Romani, N., Clausen, B.E., Stoitzner, P. 2010.** Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews*. Volume 234, Issue 1, p. 120-141
8. **Braun-Falco, P., Plewig, G., Wolff, H., Burgdorf, W.H.C., Landthaler, M. 2005.** *Dermatologie und Venerologie*. ed. Springer Medizin Verlag.
9. **Briggaman, R.A., Wheeler, C.E. 1975.** The epidermal-dermal junction. *Journal of investigative Dermatology*, 65(1), 71-84.
10. **Halata, Z., Munger, B.L. 1981.** Identification of the Ruffini corpuscle in human hairy skin. *Cell and Tissue Research* 219.2: 437-440.
11. **Parwaresch, M.R., Homy, H.P., Lennert, K. 1985.** Tissue mast cells in health and disease. *Pathology-Research and Practice*, 179(4), 439-461.
12. **Lauria, G. 1999.** Innervation of the human epidermis. A historical review. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, 20(1), 63-70.
13. **Forlen, H. P., Stüttgen, G. 1961.** Vergleichende Studien über die allergische Reaktion an Haut und Mundschleimhaut. *Dermatology* 122(6).
14. **Moharamzadeh, K., Brook, I.M., Van Noort, R., Scutt, A.M., Thornhill, M.H. 2007.** Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res*, 86(2): p. 115-24.
15. **Garant, P.R. 2003.** *Oral cells and tissues*. Quintessence Publishing Co, Inc.
16. **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*, p. 383-408.
17. **Orban, B. 1952.** Histology and physiology of the gingiva. *J Am Dent Assoc* 44(6): p. 624-8.
18. **Squier, C.A., Kremer, M.J. 2001.** Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (29): p. 7-15.
19. **Kunze, K. 1969.** Die Papilla filiformis des Menschen als Tastsinnesorgan: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen.

20. **Avery, J.K., Steele, P.F., Avery, N. 2002.** Oral development and histology. 3rd ed., Stuttgart ; New York. Thieme. p. 435.
21. **Calenic, B., Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Costache, M., Tovar, M., Tovar, S., Parlatescu, I. 2010.** Characterization of oral keratinocyte stem cells and prospects of its differentiation to oral epithelial equivalents. Rom J Morphol Embryol. 51(4): p. 641-5.
22. **Rzepka, K., Schaarschmidt, G., Nagler, M., Wohlrab, J. 2005.** [Epidermal stem cells]. J Dtsch Dermatol Ges, 3(12): p. 962-73.
23. **Mackenzie, I.C. 2005.** Stem Cell in Oral Mucosal Epithelia. Oral Biosciences & Medicine Vol.2.
24. **Alberts, B. 2011.** Molekularbiologie der Zelle. 5.Auflage. Weinheim. Wiley-VCH.
25. **Jones, P.H., Watt, F.M. 1993.** Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. Cell. 73(4): p. 713-24.
26. **Zhu, A.J., Haase, I., Watt, F.M. 1999.** Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(12): p. 6728-33.
27. **Stein, E., Blaimauer, K., Bauer, S., Erovcic, B.M., Turhani, D., Thurnher, D. 2007.** High expression of integrin beta1 correlates with high proliferation capacity in oral keratinocytes. Wien Klin Wochenschr. 119(9-10): p. 318-22. accepted 2006
28. **Jones, P.H. 1997.** Epithelial stem cells. Bioessays. 19(8): p. 683-90.
29. **Jones, P.H., Harper, S., Watt, F.M. 1995.** Stem cell patterning and fate in human epidermis. Cell. 80(1): p. 83-93.
30. **Dabelsteen S., Mackenzie, I.C. 2006.** The stem cell concept in oral mucosa and in cancer. Nor Tannlegeforen Tid; 116: 32–36.
31. **Liu, J., Bian, Z., Kuijpers-Jagtman, A.M., Von den Hoff, J.W. 2009.** Skin and oral mucosa equivalents: construction and performance. Orthod Craniofac Res. 13(1): p. 11-20.
32. **Lüllmann-Rauch, R. 2006.** Histologie. 2. ed. Thieme.
33. **Fuchs, E., Green, H. 1980.** Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell. 19(4): p. 1033-42.
34. **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(4): p. 388-400.
35. **Fuchs, E. 1993.** Epidermal differentiation and keratin gene expression. J Cell Sci Suppl. 17: p. 197-208.
36. **Hansson, A., Bloor, B.K., Haig, Y., Morgan, P.R., Ekstrand, J., Grafström, R.C. 2001.** Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. Oral Oncol. 37(5): p. 419-30.
37. **Haas, M., Berndt, A., Hyckel, P., Stiller, K.-J., Kosmehl, H. 2000.** [Laminin-5 in diseases of the oral cavity]. Mund Kiefer Gesichtschir. 4(1): p. 25-9. Springer

38. **Bosman, F.T., Cleuthens, J., Beek, C., Havenith, M. 1989.** Basement membrane heterogeneity. *Histochem J.* 21(11): p. 629-33.
39. **Woodley, D.T., Stanley, J.R., Reese, M.J., O'Keefe, E.J. 1988.** Human dermal fibroblasts synthesize laminin. *J Invest Dermatol.* 90(5): p. 679-83.
40. **Mertsching, H., Weimer, M., Kersen, S., Brunner, H. 2008.** Human skin equivalent as an alternative to animal testing. *GMS Krankenhhyg. Interdiszip.* 3(1): p. Doc11.
41. **Rohde, H., Wick, G., Timpl, R. 1979.** Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. *European Journal of Biochemistry,* 102(1), 195-201.
42. **Martin, G.R., Timpl, R. 1987.** Laminin and other basement membrane components. *Annual review of cell biology,* 3(1).
43. **Vandenberg, P., Kern, A., Ries, A., Luckenbill-Edds, L., Mann, K., Kühn, K.1991.** Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol.* 113(6): p. 1475-83.
44. **Kaigler, D., Mooney D. 2001.** Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ.* 65(5): p. 456-62.
45. **Muller, W. 2000.** [Split skin and full-thickness skin grafts]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 4 Suppl 1: p. S314-21.
46. **UniversitätsklinikumWürzburg.** Entwicklung eines Biopolymer-Dermal-Aquivalentes für die autologe Transplantation von Mundschleimhaut. Available from: <http://mkg.uk-wuerzburg.de/abteilungen/entwicklung-eines-biopolymer-dermal-aquivalentes-fuer-die-autologe-transplantation-von-mundschleimhaut.html>.
47. **Horch, R.E., Munster, A.M., Achauer, B.M. 2001.** Cultured human keratinocytes and tissue engineered skin substitutes. Thieme.
48. **FraunhoferIGB. Tissue Engineering 2009**
<http://www.igb.fraunhofer.de/www/gf/tissueengineering/start.html>
49. **www.Invitrogen.com, Life Technologies 2011.**
1. Dulbecco, R. and Freeman, G., (1959) Plaque formation by the polyoma virus. *Virology* 8:396.
 2. Ham, R.G., (1965) Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 53:288.
 3. Morton, H.J. (1970) A survey of commercially available tissue culture media. *In Vitro* 6(2):89.
 4. Smith, J.D., Freeman, G., Vogt, M., et al., (1960) The nucleic acid of polyoma virus. *Virology* 12:185.
50. **PromocellGmbH, Cell Culture. 2010/2011.**
51. **www.Invitrogen.com, Life Technologies 2011.**
1. Dulbecco, R. and Vogt, M., (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with Poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.,* 98:167.

52. **Glauner, B. 2006.** Stromausschlussverfahren - Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. BIOSpektrum, 04.2006. 12.Jahrgang.
53. **SchärfeSystemGmbH,** Bedienungsanleitung CASY Cell Counter + Analyser System Modell TT.
54. **Roche, www.roche-applied-science.com** Cat.No. 11 644 807001.
55. **Roche 1999.** Cell Proliferation Reagent WST - 1.
56. **Roche,** https://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/index.jsp?&id=xcept_010100.
57. **Chinnathambi, S., Tomanek-Chalkley, A., Ludwig, N., King, E., DeWaard, R., Johnson, G., Wertz, P.W., Bickenbach, J.R. 2003.** Recapitulation of oral mucosal tissues in long-term organotypic culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 270(2): p. 162-74.
58. **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(3): p. 181-7.
59. **Nakamura, T., Endo, K.-I., Kinoshita, S. 2007.** Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells.* 25(3): p. 628-38.
60. **Jones, P.H. 1996.** Isolation and characterization of human epidermal stem cells. *Clin Sci (Lond).* 91(2): p. 141-6.
61. **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(5): p. 571-7; discussion 577-8.
62. **Arenholt-Bindslev, D., Jepsen, A., MacCullum, D.K., Lillie, J.H. 1987.** The growth and structure of human oral keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol.* 88(3): p. 314-9.
63. **Lauer, G. 1994.** Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. Method and clinical application. *J Craniomaxillofac Surg.* 22(1): p. 18-22.
64. **Lauer, G., Schimming, R. 2002.** [Clinical application of tissue-engineered autologous oral mucosa transplants]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 6(6): p. 379-93.
65. **Sauerbier, S., Gutwald, R., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Lauer, G., Schmelzeisen, R. 2006.** Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa. *Clin Oral Implants Res.* 17(6): p. 625-32.
66. **Lauer, G., Otten, J.E., Schilli, W. 1997.** [Modifications in cultivating gingival keratinocytes]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 1(1): p. 31-4.
67. **Kedjarune, U., Pongprerachok, S., Arpornmaeklong, P., Ungkusonmongkhon, K. 2001.** Culturing primary human gingival epithelial cells: comparison of two isolation techniques. *J Craniomaxillofac Surg.* 29(4): p. 224-31.
68. **Guo, A., Jahoda, C.A. 2009.** An improved method of human keratinocyte culture from skin explants: cell expansion is linked to markers of activated progenitor cells. *Experimental dermatology,* 18(8), 720-726.

69. **Rheinwald, J.G., Green, H. 1975.** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6(3): p. 331-43.
70. **Pomahac, B., Svensjö, T., Yao, F., Brown, H., Eriksson, E. 1998.** Tissue engineering of skin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 9(3): p. 333-44.
71. **Southgate, J., Williams, H.K., Trejdosiewicz, L.K., Hodges, G.M. 1987.** Primary culture of human oral epithelial cells. Growth requirements and expression of differentiated characteristics. *Lab Invest*. 56(2): p. 211-23.
72. **Kriegebaum, U. 2011.** Entwicklung eines gewebeähnlichen Konstruktes aus einer Matrix mit in vitro kultivierten Fibroblasten und Keratinozyten zum Ersatz der Oralmukosa unter Einsatz von Tissue Engineering. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
73. **Lauer, G., Otten J.E., von Specht, B.U., Schilli, W. 1991.** Cultured gingival epithelium. A possible suitable material for pre-prosthetic surgery. *J Craniomaxillofac Surg*. 19(1): p. 21-6.
74. **Tenchini, M.L., Ranzati, C., Malcovati, M. 1992.** Culture techniques for human keratinocytes. *Burns*. 18 Suppl 1: p. S11-6.
75. **Coolen, N.A., Verkerk, M., Reijnen, L., Vlig, M., van den Bogaerdt, A.J., Breetveld, M., Gibbs, S., Middelkoop, E., Ulrich, M.M. 2007.** Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell Transplant*. 16(6): p. 649-61.
76. **Masuda, I. 1996.** [An in vitro oral mucosal model reconstructed from human normal gingival cells]. *Kokubyo Gakkai Zasshi*. 63(2): p. 334-53.
77. **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(1 Suppl): p. 33s-40s.
78. **Liu, S.C., Karasek, M. 1978.** Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. *J Invest Dermatol*. 71(2): p. 157-62.
79. **Tomakidi, P., Breitzkreutz, D., Kohl, A., Komposch, G. 1999.** Normalization of keratinocyte-type integrins during the establishment of the oral mucosa phenotype in vitro. *Ann Anat*. 181(1): p. 127-32.
80. **Lavker, R.M., Sun, T.T. 2000.** Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(25): p. 13473-5.
81. **Watt, F.M., Kubler, M.D., Hotchin, N.A., Nicholson, L.J., Adams, J.C. 1993.** Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions. *J Cell Sci*. 106 (Pt 1): p. 175-82.
82. **Abercrombie, M. 1970.** Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro*. 6(2): p. 128-42.
83. **Izumi, K., Tobita, T., Feinberg, S.E. 2007.** Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *J Dent Res*. 86(4): p. 341-6.

84. **Calenic, B., Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Kumazwa, Y., Nasu, M., Hirata, T. 2010.** Magnetic separation and characterization of keratinocyte stem cells from human gingiva. *J Periodontal Res.* 45(6): p. 703-8.
85. **Drukala, J., Zarzecka, J., Gojniczek, K., Waligorska, A., Zapata, J., Korohoda, W. 2005.** Comparison of proliferation and motile activity between human keratinocytes isolated from skin and oral mucosa. *Folia Biol (Krakow).* 53(1-2): p. 21-8.

9 Anhang

9.1 Abbildungen

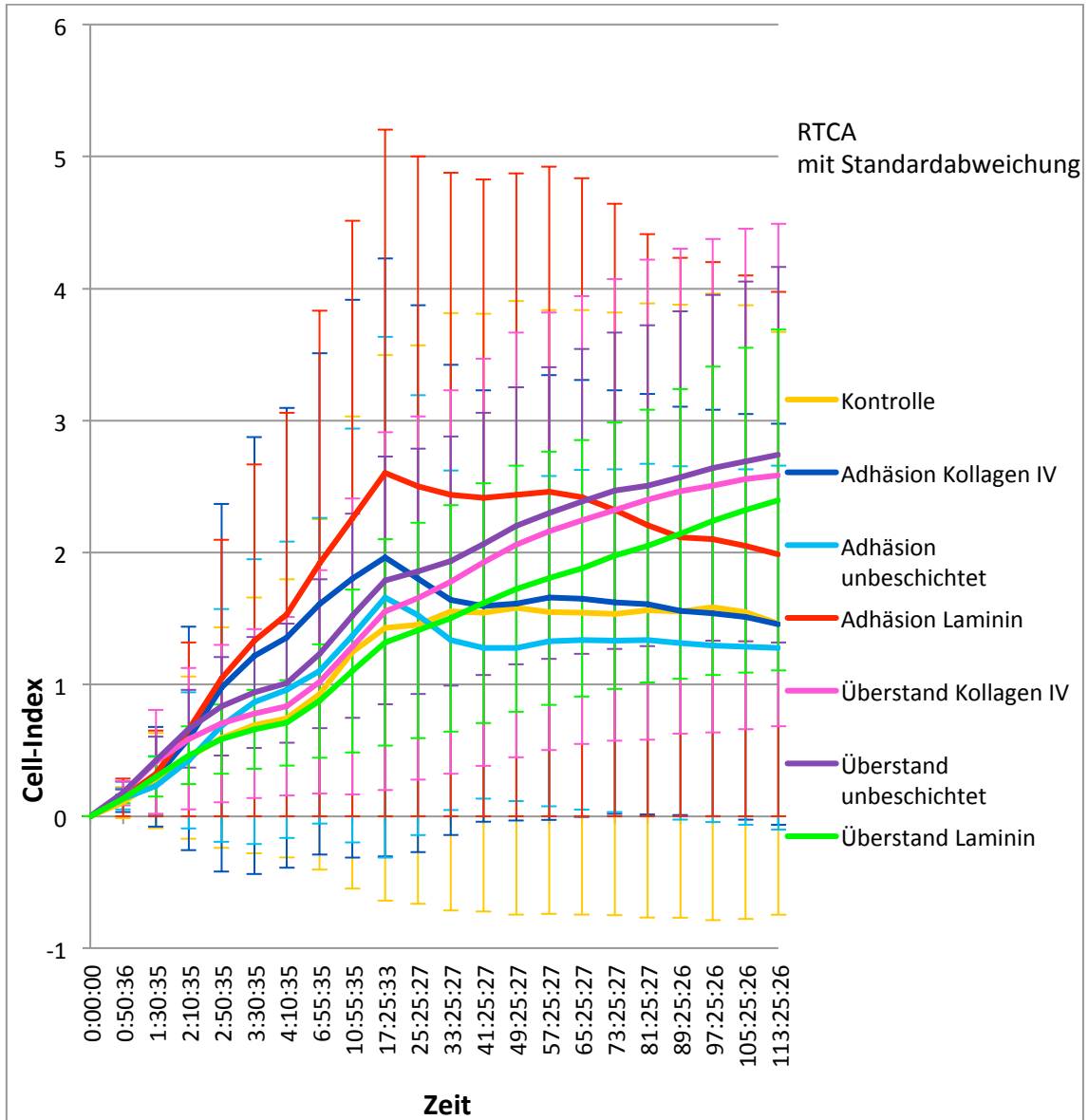


Abbildung 15b:

Darstellung des Wachstumsverhaltens von Keratinozyten mittels RTCA ermittelter Daten nach Anwendung der Behandlungsmethode über einen Zeitraum von mehr als 4 Tagen - mit Standardabweichung

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Seite 1

Aufbau der Haut, modifiziert nach Bibliographisches Institut GmbH, Mannheim [4], mit freundlicher Genehmigung durch Duden – Bibliographisches Institut GmbH

Abbildung 2 – Seite 6

Schematischer Aufbau der verhornten (A) und nicht-verhornten (B) oralen Epidermis. Abbildung verändert nach Presland and Dale [16].

Abbildung 3 – Seite 8

Verteilung der Stammzellen innerhalb der normalen Haut und deren proliferative Ausbreitung [24], mit freundlicher Genehmigung des Verlags Elsevier

Abbildung 4 – Seite 9

Schema der Stammzell-Verteilung in oralen Epithelien verändert nach Dabelsteen und Mackenzie [30]. Die Stammzellen mit der höchsten Expression von $\beta 1$ -Integrin (A) liegen neben transient amplifizierende Zellen (B) auf der Basalmembran. Die postmitotischen Zellen (C) befinden sich im suprabasalen Raum.

Abbildung 5 – Seite 12

Vereinfachtes Schema über den molekularen Bau der Basalmembran und Basallamina [32], mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlags KG

Abbildung 6 – Seite 31

Schematische Darstellung vitaler Zellen als elektrische Isolatoren im Gegensatz zu toten Zellen, deren zytoplasmatischer Raum durch die defekte Membran leitfähig wird. [52], mit freundlicher Genehmigung durch Biospektrum/Springer

Abbildung 7 – Seite 32

Aufspaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat) zu Formazan. (EC=Elektronen-Kopplungsreagenz RS=mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reductase-System) [55], mit freundlicher Genehmigung von Roche Diagnostics GmbH

Abbildung 8 – Seite 33

Messprinzip des xCELLigence Systems von Roche Applied Science [56], mit freundlicher Genehmigung von Roche Diagnostics GmbH

Abbildung 9 – Seite 36

Phasenkontrastaufnahme primärer Keratinozyten in D-MEM/Ham's-12 mit angrenzender Kontamination durch primäre Fibroblasten (leichter Befall, rote Pfeile). Die grünen Pfeile zeigen die Grenze der Keratinozyten. Elimination durch Zellschaber möglich. Vergrößerung: 40x

Abbildung 10 – Seite 37

Phasenkontrastaufnahme primärer Keratinozyten in D-MEM/Ham's-12 mit angrenzender Kontamination durch primäre Fibroblasten (starker Befall). Elimination durch Behandlung mit Versene notwendig. Vergrößerung: 40 x

Abbildung 11 – Seite 39

Wachstumskurven von Keratinozyten durch Zellzählung mittels CASY Zellzählgerät an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 nach Anwendung der Behandlungsmethode

Abbildung 12 – Seite 40

Darstellung der maximal erreichten Anzahl von Keratinozyten während des 11-tägigen Kultivierungszeitraums nach Durchführung der Adhäsionsversuche im Vergleich

Abbildung 13 – Seite 41

Proliferationskinetik von Keratinozyten nach WST-1 Messung (nach 30 Minuten Inkubation mit dem WST-1 Reagenz) an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 nach Anwendung der Behandlungsmethode

Abbildung 14 – Seite 42

Proliferationskinetik von Keratinozyten nach WST-1 Messung (nach 60 Minuten Inkubation mit dem WST-1 Reagenz) an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 nach Anwendung der Behandlungsmethode

Abbildung 15a – Seite 44

Darstellung des Wachstumsverhaltens von Keratinozyten mittels RTCA ermittelter Daten nach Anwendung der Behandlungsmethode über einen Zeitraum von mehr als 4 Tagen

Abbildung 15b – Seite 64

Darstellung des Wachstumsverhaltens von Keratinozyten mittels RTCA ermittelter Daten nach Anwendung der Behandlungsmethode über einen Zeitraum von mehr als 4 Tagen - mit Standardabweichung

Abbildung 16 – Seite 45

Darstellung des Wachstums der nach der Behandlungsmethode im Überstand verbliebenen Zellen (Zeitraum bis 41 Stunden nach Beginn der Aussaat)

Abbildung 17 – Seite 45

Darstellung des Wachstums der nach der Behandlungsmethode adhärennten Zellen (Zeitraum bis 41 Stunden nach Beginn der Aussaat)

Abbildung 18 – Seite 46

Darstellung des erwarteten Verlaufs nach Durchführung der Behandlungsmethode und Auswertung der mittels RTCA ermittelten Daten (Probe 191, Laufzeit 6:25:35, RTCA Software)

Tabelle1 – Seite 17

Zusammensetzung D-MEM/Ham's F-12 [49]

Tabelle2 – Seite 19

Konzentration nach Zugabe des „SupplementMix“ im KGM 2 [50]

Tabelle3 – Seite 21

Zusammensetzung von DPBS [51]

Tabelle 4 – Seite 35

Anzahl der geernteten Keratinozyten nach Explantation verschiedener Spenderproben

9.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tag(e)
D-MEM/Ham's F-12	„Dulbecco's Modified Eagles Medium“ mit Gerinnungsfaktor 12
DPBS	„Dulbecco's phosphate-buffered Saline“
ECM	„extracellular matrix“ (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fibroblasten
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
i.d.R.	In der Regel
K	Keratinocyten
K1, 2, 4, 5, 10, 11, 13, 14	Keratin 1, 2, 4, 5, 10, 11, 13, 14
Kap.	Kapitel
KGM	„Keratinocyte Growth Medium“
Koll. IV	Kollagen IV
L	Liter
Lam	Laminin
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	„Phosphat Buffered Saline“
P/S	Penicillin/Streptomycin
pH	„potentia Hydrogenii“ negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen bzw. Oxoniumkonzentration

rpm	,revolutions per minute' (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	Seite
Tab.	Tabelle
U	,unit' (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
WST	,Water Soluble Tetrazolium'
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

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

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

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

Dr. rer. nat. U. Kriegebaum für die kompetente Anleitung und ihre weitreichenden Anregungen während der Versuchsdurchführung

Prof. Dr. rer. nat. J. Groll für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

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

Der Studentischen Statistischen Beratung der Universität Würzburg

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des MKG-Forschungslabors für die freundliche Zusammenarbeit und die abendlichen Diskussionen

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Wizenmann für die kritische Durchsicht der Arbeit und die anregenden Gespräche