

**Genitalrekonstruktion bei Patienten mit Zustand nach
Rhabdomyosarkom des Urogenitaltraktes und
Strahlentherapie des kleinen Beckens:
Mundschleimhaut-Zellkultur-Transplantat
als Ersatz für Vaginalgewebe**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor

der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Sabine Fondel

geboren in Koblenz/Rhein

Mainz, 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Tissue Engineering: eine kurze Einführung	3
2.2	Tissue Engineering in der Urologie	5
2.3	Aufbau der humanen Mundschleimhaut	8
2.4	Zielsetzung	9
3	Material und Methoden	13
3.1	Allgemeine Arbeitstechniken der Zellkultur	13
3.1.1	Steriles Arbeiten	13
3.1.2	Kultivierung von Zellen im Monolayer	13
3.1.3	Anlegen und Auftauen von Dauerkulturen	14
3.2	Gewinnung von Zellen aus der humanen Mundschleimhaut	15
3.2.1	Herkunft des humanen Gewebes	15
3.2.2	Gewinnung von Epithelzellen	15
3.2.3	Gewinnung von Bindegewebszellen (Fibroblasten/-zyten)	16
3.2.4	Kultivierung der humanen Mundschleimhautzellen	16
3.3	Organotypische Co-Kultur	17
3.3.1	Zusammensetzung der organotypischen Co-Kultur	17
3.3.2	Vorbereitung der humanen Bindegewebszellen	17
3.3.3	Herstellung des Collagengels	17
3.3.4	Vorbereitung der humanen Mundschleimhaut-Epithelzellen	19
3.3.5	Dreidimensionale Zellkultivierungssysteme	20
3.3.5.1	Zellkultivierungssystem „Kleine Box“	21
3.3.5.2	Zellkultivierungssystem „Große Box“	22
3.3.6	Kulturbedingungen	23
3.3.7	Einfrieren der organotypischen Co-Kulturen	24
3.3.8	Reinigung der dreidimensionalen Zellkultivierungssysteme	24
3.4	Anfertigen von Gefrierschnitten	25

Inhaltsverzeichnis

3.5	Histologische Charakterisierung	26
3.5.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	26
3.5.2	PAS-Färbung	27
3.6	Immuncytochemische Charakterisierung	28
3.6.1	Allgemeine Bedeutung von Differenzierungsmarkern	28
3.6.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	29
3.6.3	Nachweis von Komponenten des Cytoskeletts	31
3.6.4	Nachweis von Produkten der extrazellulären Matrix (ECM)	32
3.7	Mutationsanalyse von Tumorsuppressorgen p53	33
3.7.1	RNA-Präparation und Isolierung	33
3.2.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	34
3.7.3	Synthese der cDNA (Reverse Transkription)	35
3.7.4	DNA-Primer von p53	36
3.7.5	Amplifikation der p53-Fragmente mittels PCR	37
3.7.6	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.7.7	Isolierung der p53-Fragmentbanden im Agarose-Gel	41
3.7.7.1	Präparative DNA-Isolierung für SSCP-Mutationsanalyse	41
3.7.7.2	Präparative DNA-Isolierung für Sequenzierung	42
3.7.8	SSCP-Mutationsanalyse der p53-Fragmente	43
3.7.9	Sequenzierung der p53-Fragmente	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Isolierung von Zellen aus der humanen Mundschleimhaut	44
4.1.1	Gewinnung humaner Mundschleimhautzellen	44
4.1.2	Kultivierung humaner Mundschleimhautzellen	44
4.2	Organotypische Co-Kulturen der „Kleinen Box“	47
4.2.1	Histologische Charakterisierung	47
4.2.1.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	47

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.2	PAS-Färbung	49
4.2.2	Immuncytochemische Charakterisierung	51
4.2.2.1	Kontrastfärbung DAPI	51
4.2.2.2	Nachweis von Cytokeratin 14 (CK 14)	52
4.2.2.3	Nachweis von Cytokeratin 4 (CK 4)	54
4.2.2.4	Nachweis von Cytokeratin 13 (CK 13)	56
4.2.2.5	Nachweis von Desmoglein 2 (DG 2)	58
4.2.2.6	Nachweis von Desmoplakin 1 und 2 (DP 1&2)	60
4.2.2.7	Nachweis von Collagen Typ IV (Coll IV)	62
4.2.2.8	Nachweis von Laminin	64
4.2.2.9	Nachweis von Fibronectin	66
4.2.2.10	Nachweis von Tenascin	68
4.3	Organotypische Co-Kulturen der „Großen Box“	70
4.3.1	Allgemeine Vorbemerkung	70
4.3.2	Histologische Charakterisierung	70
4.3.2.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	70
4.3.2.2	PAS-Färbung	71
4.3.3	Immuncytochemische Charakterisierung	72
4.3.3.1	Nachweis von Cytokeratin 14	72
4.3.3.2	Nachweis von Cytokeratin 4	73
4.3.3.3	Nachweis von Cytokeratin 13	74
4.3.3.4	Nachweis von Desmoglein 2	75
4.3.3.5	Nachweis von Desmoplakin 1 und 2	76
4.3.3.6	Nachweis von Collagen Typ IV	77
4.3.3.7	Nachweis von Laminin	78

Inhaltsverzeichnis

4.3.3.8	Nachweis von Fibronectin	79
4.3.3.9	Nachweis von Tenascin	80
4.4	Mutationsanalyse von Tumorsuppressorgen p53	83
4.4.1	Anealingtemperaturen der verwendeten DNA-Primer von p53	83
4.4.1.1	Temperaturgradient von p53-Primerpaar 1a und 1b	84
4.4.1.2	Temperaturgradient von p53-Primerpaar 2a und 2b	85
4.4.1.3	Temperaturgradient von p53-Primerpaar 3a und 3b	86
4.4.1.4	Temperaturgradient von p53-Primerpaar 4a und 4b	87
4.4.2	Amplifikation der p53-Fragmente mittels PCR	88
4.4.3	SSCP-Mutationsanalyse der p53-Genfragmente	89
4.4.3.1	Humane Mundschleimhaut als Nativmaterial	89
4.4.3.2	In vitro kultivierte Epithelzellen der Mundmukosa	90
4.4.3.3	In vitro kultivierte Bindegewebszellen der Mundmukosa	90
4.4.4	Sequenzanalyse der amplifizierten p53-Fragmente	90
4.4.4.1	Präparative DNA-Isolierung	91
4.4.4.2	Humane Mundschleimhaut als Nativmaterial	92
4.4.4.3	In vitro kultivierte Epithelzellen der Mundmukosa	92
4.4.4.4	In vitro kultivierte Bindegewebszellen der Mundmukosa	93
5	Diskussion	94
5.1	Isolierung und Kultivierung humaner Mundschleimhautzellen	94
5.2	Organotypische Co-Kulturen	98
5.2.1	Bestandteile des Cytoskeletts	98
5.2.2	Produkte der extrazellulären Matrix	100
5.2.3	Systemvergleich und Beurteilung der Züchtungsergebnisse	104
5.3	Mutationsanalyse von Tumorsuppressorgen p53	107

Inhaltsverzeichnis

5.4	Zusammenfassung und Ausblick	110
6	Literatur	112
7	Anhang	121
7.1	Tumorsuppressorgen p53	121
7.1.1	Sequenz der cDNA von p53	121
7.1.2	Charakterisierung der Exons von p53	122
7.1.3	Proteinsequenz von p53	122
7.2	Chemikalien	123
7.3	Puffer und Lösungen	125
7.4	Nährmedien	128
7.5	Abkürzungen	129

1 Zusammenfassung

Humane Mundschleimhaut wurde mit Hilfe eines speziellen dreidimensionalen Zellkultivierungssystems *in vitro* in großen, zusammenhängenden Arealen gezüchtet. Hierbei handelte es sich um eine methodische Eigenentwicklung. Die Beurteilung der physiologischen Integrität des gezüchteten Humangewebes erfolgte durch eine Vielzahl von Kenngrößen. Zu diesen Beurteilungskriterien zählten unter anderem die Expression von Cytokeratinen (CK), die Ausprägung von Komponenten des Cytoskeletts und der extrazellulären Matrix (ECM) sowie die Detektion von genetischen Mutationen.

Während sich in den ersten Kultivierungstagen die Anheftung der Epithelzellen an das Fibroblasten-Collagengel vollzog, waren die nächsten Tage in dem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem massiv von Proliferationsereignissen geprägt. Dies zeigte sich in einer gesteigerten Synthese der biochemischen Marker Fibronectin und Tenascin (Bindegewebe) bzw. Cytokeratin 14 (Epithel). Ab dem 10. Kultivierungstag traten vermehrt Differenzierungsprozesse der epithelialen Zellschichten in den Vordergrund, die sich z. B. in einer zunehmenden Expression der differenzierungsspezifischen Cytokeratine 4 und 13 äußerten und das Geschehen in der Box bis zum 14. Tag bestimmten. Nach 2 Wochen wurde bei der *in vitro* gezüchteten humanen Mundschleimhaut nicht nur ein vermehrtes Auftreten der interzellulären Bindungselemente Desmoglein 2 und Desmoplakine 1 und 2 beobachtet, sondern es zeigte sich in der PAS-Färbung die Ausbildung der Basalmembran. Damit einhergehend konnte in den organotypischen Co-Kulturen eine gesteigerte Expression von Collagen Typ IV und Laminin beobachtet werden, die bekanntermaßen die Hauptkomponenten dieser besonderen Struktur darstellen. Betrachtete man sich das morphologische Gesamtbild in der H/E-Darstellung, so ließen sich große strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen der *in vitro* gezüchteten Mundschleimhaut und dem physiologischen Nativgewebe erkennen. Demzufolge gelingt mit diesem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem, die gewebespezifische Mikroumgebung der humanen Mundhöhle so gut nachzubilden, daß die *In vitro*-Züchtung einer ausdifferenzierten und funktionell weitgehend intakten Schleimhaut gewährleistet ist. Wie die abschließenden Mutationsuntersuchungen bezüglich des Tumorsuppressorgens p53 ergaben, konnten bei den isolierten Epithel- und Bindegewebszellen keine genetischen Alterationen im Sinne einer neoplastischen Entartung gefunden werden.

2 Einleitung

Im Laufe des 19. Jahrhunderts entstand mit der Entwicklung von sterilen Arbeitstechniken und der Einführung der Anästhesie die moderne Chirurgie. Bereits zu diesem Zeitpunkt waren die Entfernung von Tumoren, die Überbrückung von Obstruktionen und die Behandlung von anderen lebensgefährlichen Verletzungen möglich. Zeitgleich setzte auch die Entwicklung der rekonstruktiven Chirurgie ein, die als Hauptziel die Wiederherstellung der eingeschränkten/verlorengegangenen Funktion von Geweben oder Organen zur Verbesserung der Lebensqualität des Erkrankten verfolgte. In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden zudem eine Reihe von modernen Operationstechniken etabliert, die eine Gewebeübertragung von einem auf ein anderes Individuum erlaubten. Die ersten Transplantationen verliefen erfolglos, da man zu diesem Zeitpunkt noch nichts von den immunologischen Grundprozessen wußte. Das änderte sich mit der Aufklärung von molekularen und zellulären Ereignissen. Als logische Konsequenz wurden Therapien entwickelt, die das Überleben des Transplantates über einen langen Zeitraum sicherstellten. Das Hauptproblem der Transplantationsmedizin konnte aber bis dato nicht beseitigt werden. So besteht immer noch eine massive Diskrepanz zwischen den benötigten und zur Verfügung stehenden Organtransplantaten. Demzufolge wird ein Großteil der Patienten das dringend benötigte Spenderorgan nicht mehr zu Lebzeiten erhalten. Um diesen Problem erfolgreich entgegenzutreten, wurden in der Vergangenheit bei einer Vielzahl von Transplantationen zusätzlich auf tierisches Organmaterial zurückgegriffen. So dienten z. B. Niere und Herz von Affe oder Schwein als potentiellen Organersatz beim Menschen. Die Verpflanzungen brachten allerdings nur über einen geringen Zeitraum den ersehnten Erfolg. So stellten sich mit fortschreitenden Beobachtungszeitraum schwerwiegende Komplikationen und Entzündungsreaktionen ein, die häufig zur Abstoßung des xenogenen Transplantates führten. Daher wurden in der jüngeren Vergangenheit der medizinischen Forschung neue Wege beschritten. Es entstanden eine Vielzahl von interdisziplinären Arbeitsfelder, wie z. B. die künstliche Gewebezüchtung (Tissue Engineering).

2.1 Tissue Engineering: eine kurze Einführung

Bei der noch sehr jungen Forschungsrichtung Tissue Engineering handelt es sich um eine Kooperationswissenschaft von Technik mit ihren vielfältigen Applikationen und der Medizin (z. B. Nerem et al. 1995). Ihr Arbeitsspektrum ist sehr breit gefächert und umfaßt neben den klassischen Disziplinen der Zellbiologie, Biochemie sowie Molekularbiologie auch die neuartigen Fachrichtungen der Materialwissenschaften und des Bioengineerings (Vacanti et al. 1993). Das Hauptziel des Tissue Engineerings besteht darin, unter Verwendung von neuartigen Techniken und Materialien biologisch-äquivalente Substituenten zur Aufrechterhaltung, Sicherstellung und Wiederherstellung der Gewebe- bzw. Organfunktion zu züchten. Die Einsatzmöglichkeiten des funktionellen Gewebeersatzes sind vielfältig und umfassen vor allem die Gebieten der Transplantation, Implantation und Prothetik. Die Forschungsansätze der künstlichen Gewebezüchtung sind breit gefächert. So sehen einige Arbeitsgruppen in der Verwendung von gewebespezifischen Substanzen wie z. B. Signalmoleküle oder Wachstumsfaktoren eine vielversprechende Ansatzmöglichkeit, wobei ein Forschungserfolg unmittelbar mit dem gesicherten Rücktransport der Moleküle an ihren Bestimmungs- oder Wirkungsort gekoppelt ist (Langer et al. 1993). Ein anderer Strategieansatz beschäftigt sich intensiv mit der Kultivierung von isolierten Zellen und/oder Zellsubstituenten, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen von elementarer Bedeutung sind. Limitierend ist aber dato die Tatsache, daß die Zellen mitunter nur über einen kurzen Zeitraum ihre Funktionen *in vitro* (d. h. außerhalb ihrer natürlichen Umgebung) aufrechterhalten können. Mit großem Arbeitsaufwand laufen derzeit auch Forschungsprojekte, bei denen isolierte Zellen in Kombination mit speziellen Polymerstrukturen (Matrizes) kultiviert werden (siehe hierzu auch Abb. 1), um durch Interaktionen der beteiligten Funktionseinheiten physiologisch-intakte Gewebeeinheiten zu bilden (Putnam et al. 1996).

Bereits die ersten Erfolge ließen aufhorchen. So ist es gelungen, funktionstüchtiges Hautmaterial (Boyce et al. 1995; von Donnersmark et al. 1995; Rennekampff et al. 1996) und physiologisches Knorpel- und Knochengewebe (Bizio 1994; Frangos et al. 1993, Olivia et al. 1996) in größeren Arealen *in vitro* zu züchten. Auch in der plastischen Chirurgie hat das Tissue Engineering mittlerweile sehr erfolgreich Einzug

gehalten und wird bereits routinemäßig zur Herstellung von funktionellen Transplantaten eingesetzt (Puelacher et al. 1994; Sittinger et al. 1996a, b).

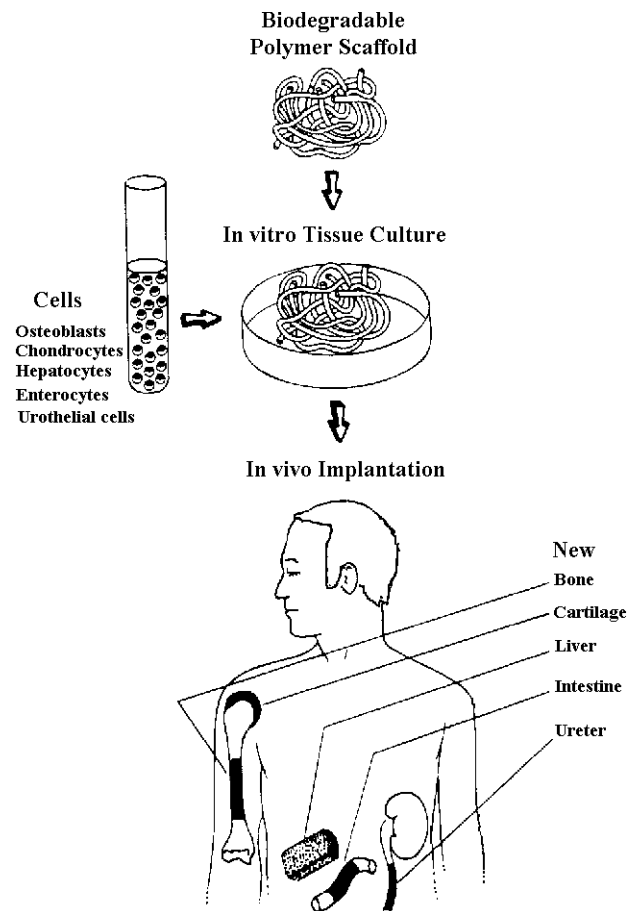


Abb. 1: Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten des Tissue Engineerings (aus Science: Langer et al. 1993).

Zusammenfassend betrachtet könnte dieses interdisziplinäre Forschungsgebiet mit seiner unerschöpflichen Einsatzmöglichkeiten zukünftig die einmalige Möglichkeit bieten, mit einem Mindesteinsatz an organischem Gewebematerial für einen physiologisch intakten und vollkommen funktionstüchtigen Zell-, Gewebe- oder sogar Organersatz zu sorgen.

2.2 Tissue Engineering in der Urologie

Diese Erfolge stimmten sehr optimistisch, das Tissue Engineering mit seinen vielfältigen Einsatzmöglichkeiten auch in der urologischen Forschung einzusetzen (zur Übersicht siehe Atala et al. 1998). Zur Therapie von urologischen Erkrankungen wurden in der Vergangenheit verstärkt synthetische Materialien wie z.B. Teflon (Politano et al. 1982; O'Donnell et al. 1984) oder Silikon (Atala et al. 1994c) in unterschiedlichen Verbindungen therapeutisch eingesetzt. Vor allem bei Behandlung der Blaseninkontinenz konnten anfangs große Erfolge erzielt werden. Durch weiterführende Forschungen stellte sich aber heraus, daß der Einsatz dieser Substanzen mit erheblichen gesundheitlichen Risiken für den Patienten verbunden war. Im Tierversuch konnte z. B. eindrucksvoll gezeigt werden, daß nach der Injektion in den Urogenitaltrakt (Harnblase) die Teflon-Partikel sowohl in die angrenzenden als auch weit entfernten Organe wie Lunge oder Gehirn einwanderten und dort massive Immunreaktionen auslösten (Malizia et al. 1984; Claes et al. 1989). Dieses gefährliche Migrationsverhalten wurde bereits für das Silikon eingehend beschrieben. Auch die Verwendung natürlicher Materialien als alternativer Therapieansatz brachte nur über einen geringen Behandlungszeitraum den ersehnten Erfolg in der urologischen Chirurgie (Joyner et al. 1996). Erschwerend kam hinzu, daß die Krankheitsbilder des Urogenitalsystems häufig so massiv waren, daß sie zu einem Gewebe- oder Funktionsverlust des kompletten Organs führten und weitreichende Rekonstruktionsmaßnahmen erforderlich machten. Diese scheiterten in der Vergangenheit oft an der limitierenden Verfügbarkeit von humanem Urothelgewebe. Daher wurde bei einer Vielzahl von notwendigen Transplantationen auf autologes Gewebematerial anderer Körperregionen zurückgegriffen (Atala et al. 1994a). So verpflanzte man in den letzten Jahren z. B. Gastrointestinalgewebe zur Rekonstruktion von Blase und Harnleiter, während angeborene Mißbildungen des weiblichen Genitale in der Regel durch die Transplantation von autologem Darmgewebe korrigiert wurden (Hendren et al. 1994). Bei denen im Rahmen von Fehlbildungen des Harnleiters (Hypospadien) vorgenommenen Rekonstruktionen fanden vor allem Haut und Schleimhautmaterial der Blasenwand als freie Transplantate Verwendung (Hendren et al. 1986; Retik et al. 1994). Alle diese Substitutionen waren häufig von schwerwiegenden Komplikationen begleitet, die sich beim Patienten in Form von

Infektionen, metabolische Abnormitäten, Perforation (Darmgewebe) und Entartungen/Malignität manifestierten. Zudem konnte in den seltensten Fällen der physiologische Status der Organfunktion wieder hergestellt werden (Atala et al. 1994b). Bei der Suche nach alternativem Gewebematerial stellte sich durch vergleichende histologische Betrachtungen heraus, daß der Wandaufbau der ableitenden Harnwege und der Mundschleimhaut große strukturelle Gemeinsamkeiten aufzeigen (Junqueiro und Carneiro 1991). Für die Verwendung der humanen Mundschleimhaut als freies Transplantat im Rahmen von urologischen Rekonstruktionsmaßnahmen sprechen weiterhin ihre direkte Zugänglichkeit in der Mundhöhle sowie ihre schnelle Regeneration. Im Gegensatz zu anderen Gewebetypen wird das humane Mundschleimhautepithel sehr schnell regeneriert (Gingivaepithel: 8-10 Tage; Haut: 30 Tage; Junqueiro und Carneiro 1991) und zeigt nur eine geringe Tendenz zur Narbenbildung. Dies und die Tatsache, daß der Einsatz von humaner Mundschleimhaut in der plastischen Chirurgie bereits etabliert ist, stimmten sehr optimistisch, dieses Gewebe als freies Transplantat auch in der Urologie einzusetzen. In Tierversuchen wurde die Mundschleimhaut bereits auf ihre Tauglichkeit als potentieller Gewebeersatz für das Urothel getestet. Bahnbrechend waren die Forschungsergebnisse der letzten 10 Jahre. Bürger führte die Experimente von Humby weiter, der zu Beginn der 40er Jahre des letzten Jahrhunderts als erster erfolgreich Mundschleimhaut in den Urogenitaltrakt verpflanzte. Er entfernte bei Hunden einen Teil der Harnröhre und ersetzte diesen Abschnitt durch autologes Mundschleimhautgewebe. Wie eine Untersuchung nach drei Monaten ergab, zeigte die Transplantate bei allen Versuchstieren neben einer ausgezeichneten Vaskularisation keinerlei Schrumpfungstendenzen. Die Mundschleimhaut hatte sich somit vollständig in die Harnröhre integriert (Bürger et al. 1992). Vergleichbare Resultate konnte eine japanische Forschungsgruppe erzielen. Sie substituierten ebenfalls im Tiermodell (Hund) das komplette Urothel der Harnblase durch natives Mundschleimhautgewebe. Auch hier wuchsen die Transplantate nicht nur ohne Komplikationen im Urogenitaltrakt an, sondern konnten sogar das Ursprungsgewebe funktionell ersetzen (Iizuka et al. 1996). Auch bei der Verpflanzung von Mundschleimhaut in die Harnblasen von Minischweinen integrierte sich das transplantierte Material vollständig in die Blasenwand (Filipas et al. 1999).

Die ersten Versuche, humane Mundschleimhaut als freies Transplantat im Rahmen von Rekonstruktionsmaßnahmen beim Menschen einzusetzen (Dessanti et al. 1992; Duckett et al. 1995), verliefen ebenfalls sehr erfolgreich. So wurden bei Patienten, die im Rahmen von Harnröhren-Rekonstruktionen natives Mundschleimhautgewebe transplantiert bekamen, außer einer Fistelbildung keine weiteren Komplikationen während der Nachsorge beobachtet (Dessanti et al. 1992). Auch die Korrekturen von pädiatrischen Harnröhrenstrikturen unter Verwendung von autologem Mundschleimhautgewebe waren erfolgreich (Monfort et al. 1993).

Mit einer Inzidenz von 1:300 Geburten ist die Fehlbildung der Harnröhre, auch als Hypospadie bezeichnet, die häufigste Anomalie des männlichen Genitale. Aufgrund der vielfältigen Behandlungsweisen werden immer häufiger Stimmen laut, ein standardisiertes Behandlungskonzept mit einer geringen Komplikations- und Reinterventionsrate zu etablieren. In den letzten Jahren ging man daher an der Urologischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz neue Wege und verpflanzte vermehrt im Rahmen von Hypospadie-Rekonstruktionen humane Mundschleimhaut als freies Transplantat mit sensationellen Ergebnissen (Hohenfellner et al. 1995, Fichtner et al. 1996). So wurden lediglich bei 12 Prozent des Patientenstammes Komplikationen beobachtet, die eine postoperative Behandlung nach sich zogen (Fichtner et al. 1998). Diese geringe Komplikationsrate konnte auch bei anderen Forschungsgruppen beobachtet werden (z. B. Duckett et al. 1995). Im Zuge des vermehrten Einsatzes der humanen Mundschleimhaut als freies Transplantat im Urogenitaltrakt stellte sich die Frage, in wie weit eine intensive Urinexposition über einen längeren Zeitraum die Tauglichkeit dieses Gewebes beeinträchtigte. Eine Mainzer Arbeitsgruppe entfernte zu diesem Zweck die lokale Mucosa der Harnblasen von Minischweinen und ersetzte das Areal durch ein humanes Haut- bzw. Mundschleimhaut-Explantat. Wie die Untersuchung nach 7 Monaten ergab, zeigte das Mundschleimhautgewebe im Gegensatz zum transplantierten Hautmaterial eine geringere Entzündungsreaktion und Schrumpfung (Filipas et al. 1999). Durch weiterführende immunocytochemische Untersuchungen konnten die Wissenschaftler weiterhin die Expression von Cytokeratin 20 im Mundschleimhaut-Transplantat nachweisen, das in der Regel nur „urothelspezifisch“ exprimiert wird. Diese Resultate unterstreichen die Eignung der Mundschleimhaut als Ersatz für Urothelgewebe.

2.3 Aufbau der humanen Mundschleimhaut

Die humane Mundschleimhaut kleidet als inneres Gewebe die gesamte Mundhöhle aus und zeigt in ihrem Aufbau regionale Unterschiede. Der strikte histologische Aufbau läßt eine Separation in Epithel, Bindegewebe (Lamina propria) und „Unterfütterungsschicht“ (Tela submucosa) erkennen. Die Mundschleimhaut ist an Wangen und Lippen sehr dick ($490 \pm 90 \mu\text{m}$) und am Mundboden besonders dünn ($86 \pm 13 \mu\text{m}$) ausgeprägt. Das Epithel ist überall mehrschichtig und enthält Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkelzellen sowie kleine Lymphozyten. Eine Verhornung (Stratum Corneum) besitzen aufgrund ihrer massiven Beanspruchung nur das orale Gingivaepithel, das Epithel des harten Gaumens und die Zunge. Im Gegensatz zu anderen Gewebetypen wird das humane Mundschleimhautepithel sehr schnell regeneriert. Die Versorgung erfolgt über das darunter liegende Bindegewebe, das neben feinen Blutgefäßen auch Lymphozyten enthält. Die Verzahnung zwischen Epithel und Bindegewebe ist an mechanisch beanspruchten Stellen (z. B. Oberrand der Gingiva, harter Gaumen) sehr fest. Dort ist die Lamina propria nicht nur sehr derb, zell- und kollagenreich sondern auch direkt mit dem Periost der angrenzenden Knochen verbunden. An Lippen, Wangen, Mundboden und weichem Gaumen hingegen sind die subepithelialen Schichten reichlich mit elastischen Fasern ausgestattet. Die humane Mundschleimhaut ist an vielen Stellen von seromukösen Drüsen durchsetzt (Glandulae labiales, Glandulae buccales, Glandulae sulinguales, Glandulae palatinae). Eine optimale Inervation wird durch freie zum Teil intraepitheliale Nervenfaserverendigungen und die sogenannten „Meißner“-Körperchen bewerkstelligt.

Ein Besonderheit, die alle Epithelien so auch die Mundschleimhaut gemeinsam haben, ist die Ausbildung einer Basalmembran (BM). Hierbei handelt es sich um eine extrazelluläre Zellscheide, die an der Grenzfläche von Epithel und Bindegewebe lokalisiert ist (Alberts et al. 1990). Die Funktionen von Basalmembranen sind vielfältig. Sie sind z. B. an elementaren Zellprozessen wie Zellwanderung und Zellstoffwechsel beteiligt und haben einen direkten Einfluß auf die Zellarchitektur.

2.4 Zielsetzung

Klinische Erfahrungen und tierexperimentelle Ergebnisse stimmten optimistisch, die humane Mundschleimhaut als freies Transplantat auch in der urologischen Chirurgie einzusetzen. Limitierend ist bis dato aber noch ihre freie Verfügbarkeit in der Mundhöhle. Es galt daher eine Möglichkeit zu entwickeln, welche die Anzucht von humaner Mundschleimhaut außerhalb ihrer natürlichen Umgebung ermöglichte. Daher waren in Annäherung an die gewebetypische Umgebungsbedingungen in der humanen Mundhöhle sowohl ein spezifisches Zellkultivierungssystem als auch eine besondere Zellkultivierungstechnik zu etablieren. In einem zweiten Arbeitsschritt sollte durch zusätzliche Modifikationen dieser neuartigen Methode eine *in vitro* Züchtung von physiologisch-intaktem und ausdifferenziertem Mundschleimhautgewebe in größeren, zusammenhängenden Arealen ermöglicht werden. Die Entwicklung eines geeigneten Zellkultivierungssystem erfolgte in Anlehnung an das *in vitro* Tumormodell von Dr. A. Minchinton, das die Kultivierung von epithelialen Tumorzellen des Mammakarzinoms (SiHa) über einen längeren Zeitraum erlaubte (zur Übersicht siehe Minchinton et al. 1996, Wilson et al. 1997, 1998).

Bei der Entwicklung einer spezifischen Zellkultivierungstechnik war zu beachten, daß physiologische Epithelzellen während der Proliferations- und Differenzierungsphase, im Gegensatz zu den etablierten Tumorzell-Linien epithelialen Ursprungs, intensiv mit ihrer mesenchymalen Umgebung interagieren (z B. Smola et al. 1993; Limat et al. 1991 und 1996). Durch dieses Wechselspiel werden eine Vielzahl von „löslichen Faktoren“ *de novo* synthetisiert bzw. hochreguliert, die für das Wachstum und die dreidimensionale Struktur eines physiologisch intakten Gewebeverbands von elementarer Bedeutung sind. Zu den wichtigsten Vertretern zählen die Integrine, die maßgeblich an Zell- Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind (zur Übersicht siehe Hynes, 1992; Breitkreutz et al. 1997; Graber et al. 1999). Des weiteren sind die Interleukine/Cytokine (Maas-Szabowski 1999, 2000) und die „klassischen“ Wachstumsfaktoren zu nennen. Die Art und Weise, wie die Kommunikation zwischen Epithel und Mesenchym in Detail vonstatten geht, ist noch nicht eindeutig geklärt. Nach dem derzeitigen Forschungsstand ist wissenschaftlich fundiert, daß es eine intensive Beziehung zwischen dem epithelialen Wachstumsfaktor KGF (*keratinocyte growth factor*) und dem Interleukin IL-1 gibt (z. B. Maas-Szabowski et al. 1996, 1999, 2000).

Um eine physiologisch intakte Mundschleimhaut *in vitro* zu erhalten, müssen die isolierten Epithel- und Bindegewebszellen einer Körperregion gemeinsam d. h. in Co-Kultur gezüchtet werden (Fusenig et al. 1983, 1994). Diese Kultivierungstechnik wurde in der Vergangenheit bereits sehr erfolgreich zur Züchtung von humaner Dermis am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. E. eingesetzt (Maas-Szabowski et al. 1999; Stark et al. 1999). Durch Weiterentwicklung der organotypischen Co-Kultur ist es einem seiner Mitarbeiter gelungen, humane Mundschleimhaut in sehr kleinen Arealen zu züchten (Tomakidi et al. 1997). Dr. Pascal Tomakidi, der diese Arbeit auch beratend unterstützte, setzte in seinem „Schleimhautmodell“ die organotypische Co-Kultur, bestehend aus dem die Fibroblasten/-zyten enthaltenden Collagengel und den Keratinozyten) zentral auf eine semipermeable Polycarbonatmembran, die zuvor auf einem Metallgitter plaziert und mit serumhaltiger Nährlösung benetzt wurde (siehe Abb. 2). Die Kultivierung erfolgt anschließend in einer Multischale bei 37 °C und 5%iger (v/v) CO₂-Atmosphäre.

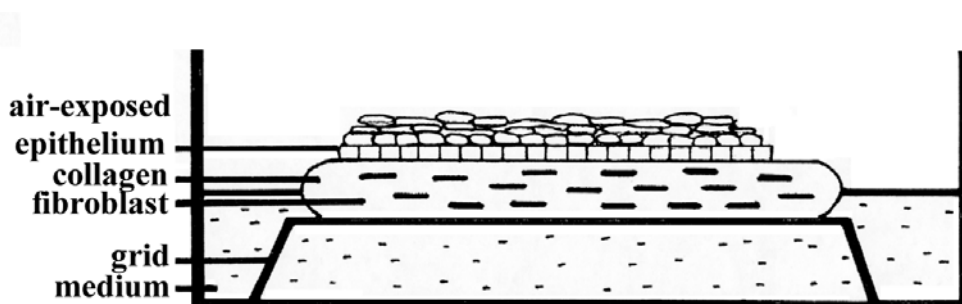


Abb. 2: Schema des „Schleimhautmodells“ (aus Journal of Peridontal Research: Tomakidi et al. 1997).

Aufgrund der erfolgreichen Resultate der letzten Jahren, sollte die Züchtung der humanen Mundschleimhaut in dieser Arbeit ebenfalls mit der organotypische Co-Kultur erfolgen.

Um den physiologischen Bedingungen in der Mundhöhle bei der Kultivierung *in vitro* sehr nahe zu kommen, wurde außerdem ein Phasengradient aus Medium und Luft/Gasgemisch aufgebaut.

Damit Probenmaterial in ausreichender Menge vorhanden war, wurden Kooperationen mit der Urologischen Klinik in Mainz und der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in Mainz aufgebaut. Um die Gefahr einer Kontamination gering zu halten, sollten die Entnahme und die Aufarbeitung des nativen Humangewebes unter sterilen Bedingungen erfolgen.

Als Präparationsmethoden wurden sowohl die Explantat- als auch die Einzelzellensuspensionstechnik gewählt und die Zellkultivierung wurde nach Rücksprache mit dem Kooperationspartner Dr. P. Tomakidi (Mund und Kieferklinik, Heidelberg) mit der organotypischen Co-Kultur durchgeführt (zur Übersicht siehe Tomakidi et al. 1997).

Weiterhin waren Kenngrößen zu erarbeiten, die eine Beurteilung der physiologischen Integrität dieser außerhalb des menschlichen Körpers kultivierten Mundschleimhaut gewährleisten. Ein wichtiges Beurteilungskriterium war die Expression von Cytokeratinen (CK). So sollten neben den differenzierungsspezifischen Cytokeratinen 4 und 13 auch das epithelspezifische Cytokeratin 14 mit der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Um die Ausbildung von interzellulären Strukturen zu untersuchen, wurden die desmosomalen Vertreter Desmoglein 2 und Desmoplakin 1 und 2 in die Untersuchungen einbezogen. Neben diesen Komponenten des Cytoskeletts sollten auch Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) immunocytochemisch detektiert werden. Hierzu zählten Collagen Typ IV und Laminin, die als Hauptbestandteile die Basalmembran aufbauen. Weiterhin wurden noch das Adhäsionsmolekül Fibronectin sowie der biochemische Marker Tenascin, die ausschließlich von mesenchymale Zellen exprimiert werden, zur Beurteilung der physiologischen Integrität herangezogen. Um das morphologische Gesamtbild zu charakterisieren, wurden neben der Hämatoxylin-Eosin-Färbung auch die PAS-Reaktion eingesetzt, wobei sich mit letzterer Darstellung auch die Ausbildung einer Basalmembran nachweisen ließ.

Eine Anzüchtung von Gewebe/Zellen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung birgt mitunter große Risiken, die sich z. B. auch in Mutationen manifestieren und zur Entstehung von Tumoren führen können (z. B. Boukamp et al. 1988; Fusenig et al.

1998; Javaherian et al. 1998). Um das Auftreten von genetischen Alterationen bei den isolierten Epithel- und Bindegewebszellen zu untersuchen, mußte ein geeigneter Testparameter gefunden werden. Die Wahl fiel auf das Tumorsuppressorgen p53 bzw. sein Produkt, das von allen Zellen konstitutiv exprimiert wird und vielfältige Funktionen im Zellstoffwechsel ausübt. Da p53 in mehr als der Hälfte von allen bekannten humanen Tumoren in mutierter Form vorliegt, wird dieser Marker bereits in der medizinischen Diagnostik routinemäßig eingesetzt. Die mutationsanalytischen Untersuchungen erfolgten mit der SSCP-Analyse sowie der Sequenzierungsmethode nach Sanger.

Die Ziele der vorliegenden Untersuchung lassen sich daher abschließend wie folgt zusammenfassen:

- I Etablierung einer organotypischen Kultur für die Mundschleimhaut des Menschen aus nativem Primärgewebe
- II Beurteilung der Differenzierung der gezüchteten Mundschleimhaut über das Expressionsmuster biologischer Marker
- III Entwicklung einer Kultivierungstechnik zur Züchtung großer Areale aus künstlicher Mundmukosa
- IV Abschätzung der Mutagenitätsgefahr durch die Kultivierungsbedingungen unter Verwendung einer molekularen Mutagenitätsanalyse.

3 Material und Methoden**3.1 Allgemeine Arbeitstechniken der Zellkultur****3.1.1 Steriles Arbeiten**

Sofern nicht sterile Einmalartikel Verwendung fanden, wurden die Glasflaschen heißluftsterilisiert (180 °C für 4 h, Sterilisator TK2/56, Dipl. Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen). Bei allen anderen Gefäßen und hitzestabilen Lösungen erfolgte die Sterilisation durch Autoklavieren gemäß der Programmvorschrift des verwendeten Gerätes (Tuttnauer ELV5050, Systec, Wetzlar); eine Entkeimung der thermolabilen Flüssigkeiten wurde durch Sterifiltration erzielt (Sterilfilter mit Porenweite 0,2 µm, Satorius, Göttingen). Die sterilen Arbeiten fanden unter der Verwendung von Einmalhandschuhen an der Sicherheitswerkbank (BSB 3A, Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim) nach sorgfältiger Desinfektion der Arbeitsfläche mit 70%igem (v/v) Isopropanol (Ethylalkohol, Vogel, Mainz) statt.

3.1.2 Kultivierung von Zellen im Monolayer

Die Kultivierung von Zellen im Monolayer erfolgte standardgemäß in speziellen strahlensterilisierten Zellkulturflaschen (Falcon, Fisher Scientific, Nidderau) mit einer Kulturfläche von 75 cm² in 15 ml serumhaltigen Mediums bei einer Einsaatdichte von 1x10⁶ Zellen und einer Dauer von 7 Tagen. Während dieser Zeit bildete sich ein zusammenhängender Zellrasen aus, d. h. die Zellen erreichten den Zustand der Konfluenz. Um die Zellen in Kultur zu halten, mußten sie durch Trypsinierung passagiert bzw. subkultiviert werden. Hierzu wurde die Nährlösung entfernt und die Kulturflasche sorgfältig mit 15 ml steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer, Rezept siehe 7.3) gespült, um alle serumhaltigen Rückstände, die sich störend auf die Enzymwirkung auswirken, zu entfernen. Nach Zusatz von 3.0 ml der Proteaselösung Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%, Sigma, Deisenhofen) folgte die Inkubation bei 37 °C (Brutschrank). Nach einer Inkubationszeit von maximal 5 min zeigte die mikroskopische Kontrolle (Phasenkontrast-Inversmikroskop, Olympus, Hamburg) bereits eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden. Die Enzymreaktion

wurde durch Zugabe von 5 ml serumhaltiger Nährlösung beendet, worauf die Zellzahl pro Milliliter unter Verwendung eines Cellcounters (Casy Analyser System, Casy 1, Schärfe System, Reutlingen) bestimmt wurde.

3.1.3 Anlegen und Auftauen von Dauerkulturen

Um isoliertes Zellmaterial mit niedriger Passagenzahl zu sichern, mußten Dauerkulturen angelegt werden. In einem sterilen Dauerkulturgefäß (2.0 ml, Nunc, Wiesbaden) wurden 1 ml Zellsuspension ($2-4 \times 10^6$ Zellen/ml) mit 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisenhofen) sorgfältig vermischt, 8 h bei -20 °C inkubiert und über Nacht bei -70 °C zwischengelagert. Die eingefrorene Probe wurde am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt und in einem speziellen Vorratsbehälter (Dewar) bei -178 °C aufbewahrt.

Beim Auftauen der Dauerkultur mußte zügig gearbeitet werden, da das kryoprotektive Agens DMSO bei Raumtemperatur die Zellmembranen irreparabel schädigt und dadurch die Ausbeute an lebensfähigen Zellen empfindlich beeinflusst. Das Kryoröhrchen wurde vorsichtig aus dem Dewar herausgenommen und bei Raumtemperatur solange inkubiert, bis die Zellsuspension nahezu vollends aufgetaut war. Nach der sorgfältigen Desinfektion des Dauerkulturgefäßes mit 70%igem Ethylalkohol erfolgten die weiteren Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen. Nach dem Aufschrauben des Kryoröhrchens konnten die Zellen nach Abflammen des Gefäßrandes in eine 75 cm²-Zellkulturflasche pipettiert und mit 15 ml serumhaltiger Nährlösung versorgt werden. Nach 8 h und 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um vorhandene Zellfragmente (Zelltrümmer) und eventuelle Rückstände des kryoprotektiven Agens DMSO vollständig zu entfernen.

3.2. Gewinnung von Zellen aus der humanen Mundschleimhaut**3.2.1 Herkunft des humanen Gewebematerials**

In dieser Dissertation fanden ausschließlich primäre Bindegewebs- und Epithelzellen Verwendung, deren Isolierung aus humanen Mundschleimhaut-Biopsien der Wange erfolgte. Das Gewebematerial (5x5 mm²) wurde unter sterilen Bedingungen in der Urologischen Universitätsklinik und der Mund- und Kieferklinik in Mainz entnommen und bis zu ihrer weiteren Verarbeitung in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Fisher Scientific, Nidderau) in der sterilen Nährlösung DMEM bei 4 °C gelagert. Hierbei handelte es sich um DULBECCO's Modification Eagle's Medium (DMEM, Sigma, Deisenhofen), in Anreicherung mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum Cosmic Calf (CC, Hyclone, Greiner, Frickenhausen), 100 IU/ml Penizillin und 100 IU/ml Streptomycin (Sigma, Deisenhofen).

3.2.2 Gewinnung von Epithelzellen

Die entnommene Mundschleimhaut wurde zunächst an der sterilen Werkbank in 70%igem Alkohol desinfiziert und sorgfältig in sterilem, einfach konzentrierten PBS-Puffer (Rezept siehe 7.4) gewaschen. Mit feinen sterilen Scheren und Pinzetten (Aesculap, Tuttlingen) erfolgte die Trennung in Epithel- und Bindegewebe. Das Epithel wurde anschließend mechanisch zerkleinert, bis eine schleimige Masse entstand. Die Zugabe von 3 ml Protease Dispase Grade II (Roche, Mannheim) unterstützte die Isolierung epithelialer Einzelzellen. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Fisher Scientific, Nidderau) erfolgte die 30minütige Inkubation bei 37 °C (Brutschrank). Die Enzymreaktion wurde anschließend durch Überschichten mit FAD_{komplett} beendet. Bei dieser Nährlösung handelte es sich um ein komplexes Gemisch, das die Bedürfnisse der epithelialen Mundschleimhautzellen optimal berücksichtigt (Rezept siehe 7.4). Nach einer 10minütigen Zentrifugation mit 1200 rpm bei Raumtemperatur in der Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau) wurde das Zellpellet erneut in diesem Nährmedium resuspendiert und in einer kleinen strahlensterilisierten Gewebekulturflasche (Fassungsvolumen: 25 cm², Falcon, Fisher Scientific, Nidderau) ausplattiert.

3.2.3 Gewinnung von Bindegewebszellen (Fibroblasten/-zyten)

Das bei der Präparation des Epithels anfallende Bindegewebe wurde mechanisch grob zerkleinert. Die erhaltenen Gewebestücke ließen sich anschließend mit geringem Abstand ebenfalls in eine kleine Gewebekulturflasche (Fassungsvolumen 25 cm²) unter Zugabe von 1,5 ml der serumhaltigen Nährlösung DMEM plazieren.

3.2.4 Kultivierung der humanen Mundschleimhautzellen

Die Kultivierung der Zellexplantate erfolgte bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Luft-Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂-Anteil in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau). Die Medienwechsel (FAD_{komplett} bei den Epithelzellen bzw. DMEM bei den Bindegewebszellen) fanden bis zum Auswachsen der ersten Zellen 2x wöchentlich statt; danach erfolgte der Austausch der Nährlösungen 3x in der Woche. Bei Konfluenz mußten die Humanzellen vom Flaschenboden abgelöst und in eine größere Gewebekulturflasche umgesetzt werden. Nach Abpipettieren der Nährlösung wurde hierzu die Kulturflasche sorgfältig mit sterilem PBS-Puffer (Rezept siehe 7.3) gespült. Es folgte die Enzymbehandlung (Trypsinierung) mit 2,0 ml der Trypsin/EDTA-Lösung. Nach beenden der Enzymreaktion durch Medienzugabe (5 ml) wurden die noch in der Zellsuspension enthaltenen Gewebeexplantate unter Verwendung eines Zellsiebs (Falcon, Fisher Scientific, Nidderau) entfernt. Vorsichtiges Auf- und Abpipettieren dienten zur Auflösung noch vorhandener Zellaggregate. Die resultierenden Einzelzellen wurden in einer neuen Zellkulturflasche (Falcon, Fisher, Nidderau) mit einer Kulturfläche von 75 cm² ausgesät.

Für die organotypischen Co-Kulturen fanden nur Zellpopulationen mit niedriger Passagenzahl Verwendung. Bei den Fibroblasten/-zyten (Bindegewebszellen) waren dies die Passagen 4-6, während die epithelialen Mundschleimhautzellen ausschließlich aus der zweiten Passage genommen wurden.

3.3 Organotypische Co-Kultur**3.3.1 Zusammensetzung der organotypischen Co-Kultur**

Die organotypische Co-Kultur setzt sich im allgemeinen aus zwei unterschiedlichen aber miteinander interagierenden Zellpopulationen eines Gewebetypus zusammen. In dieser Dissertation handelte es sich um die Epithel- und Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut. Einem Collagengel wurden zunächst die isolierten Fibroblasten/-zyten zugesetzt, die ähnlich den physiologischen Verhältnissen ein weitverzweigtes Netzsystem ausbildeten. Hierauf plazierte man die isolierten humanen Epithelzellen, deren Versorgung u.a. mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren durch das darunter liegende Fibroblasten-Collagengel („Fütterschicht“) erfolgte.

3.3.2 Vorbereitung der humanen Bindegewebszellen

Die aus der humanen Mundschleimhaut isolierten Bindegewebszellen wurden einer Trypsinbehandlung (siehe Kapitel 3.1.2) unterzogen, in 5 ml serumhaltiger Nährlösung DMEM (zur Zusammensetzung des Mediums siehe 7.4) resuspendiert und gezählt (Cellcounter). Für die organotypische Co-Kultur mußte eine Zellzahl von 1×10^5 pro Milliliter eingestellt werden. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Fisher Scientific, Nidderau) überführt und bis zum Rand des Reaktionsgefäßes (Marke 50) mit serumhaltigen DMEM überschichtet. Nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 1200 rpm, Raumtemperatur) und der Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in einer geringen Menge Cosmic Calf-Serums. Der letzte Arbeitsschritt bestand in der Zugabe der Serum-Zellsuspension unter Vermeidung von Luftblasen zum Collagengel.

3.3.3 Herstellung des Collagengels

Um die Gefahr einer Kontamination so gering wie möglich zu halten, erfolgte die Herstellung des Collagengels an der sterilen Werkbank. Die einzelnen Komponenten und Konzentrationen sowie ihre prozentualen Volumenanteile sind in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Collagengels der organotypischen Co-Kultur

Komponente	Konzentration	Volumenprozent
Collagen Typ I	4 mg/ml	75
HANK's Salzlösung	gebrauchsfertig	10
Cosmic Calf (CC)	gebrauchsfertig	15
Fibroblasten/-zyten (im CC bereits enthalten)	$1,5 \times 10^5$ Zellen/ml CC	–

Auf Eis wurden zunächst das Collagen (Collagen Typ I, IBF, Leipzig) und die „Salze“ (HANK's Salze, Seromed, Berlin) vorsichtig miteinander vermischt. Eine Verlagerung des pH-Wertes der Gellösung in den neutralen Bereich erfolgte Zugabe von 5 M NaOH (Sigma, Deisenhofen, Rezept siehe 7.4), die außerdem zum Farbumschlag des Indikators der Salzlösung von gelb nach rot führte. Nach Zugabe des bovinen Serums mit den darin enthaltenen Fibroblasten/-zyten wurde ein definiertes Volumen der Gellösung (0,23 ml kleine Box; 2,5 ml große Box) luftblasenfrei in spezielle Membraneinsätze (siehe Kapitel 3.3.5: „Kleine Box“: Millicell® Culture Plate Inserts, Millipore, Eschwege, „Große Box“: Nunc Tissue Culture Inserts PC™, Nunc, Wiesbaden) gegossen, die man zuvor in sterile Petrischalen überführt hatte. Diese Membraneinsätze trugen an ihrer Unterseite eine semipermeable Membran (Biopore™ oder Polycarbonat). Das Auspolymerisieren des Gels erfolgte bei 37°C (Brutschrank) und benötigte 1 h. Nach Sättigung des erstarrten Fibroblasten-Collagengels mit der Nährlösung FAD_{komplett} wurden die Gele bei 37 °C im Brutschrank gelagert. In den nachfolgenden 24-72 h richteten sich die Fibroblasten/-zyten parallel aus und es erfolgte die Zugabe der humanen Mundschleimhaut-Epithelzellen.

3.3.4 Vorbereitung der humanen Mundschleimhaut-Epithelzellen

Die aus der humanen Mundschleimhaut isolierten und bereits einmal passagierten Epithelzellen wurden nach Erreichen der Subkonfluenz (Zustand unmittelbar vor der Konfluenz) zunächst durch Proteasebehandlung mit Trypsin/EDTA von Kulturflaschenboden abgelöst (Trypsinisierung). Die Bestimmung der exakten Zellzahl erfolgte wiederum unter Verwendung des Zellcounters. Für die organotypische Co-Kultur mußten die epithelialen Mundschleimhautzellen in Relation zu den Fibroblasten in 4fachen Überschuß und geringem Anteil der Nährlösung FAD_{komplett} eingesetzt werden. Vor der Zugabe der isolierten Epithelzellen mußte das Medium komplett von dem Fibroblasten-Collagengel abgezogen werden. Die sich anschließende 24stündige Inkubation bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Luft-Atmosphäre mit einem 5% (v/v) CO₂-Anteil diente dem Adhären der epithelialen Zellen. Hiernach wurden die Membraneinsätze mit den organotypischen Co-Kulturen unter sterilen Bedingungen in die neu entwickelten dreidimensionalen Zellkultivierungssysteme überführt (siehe Abb. 3).

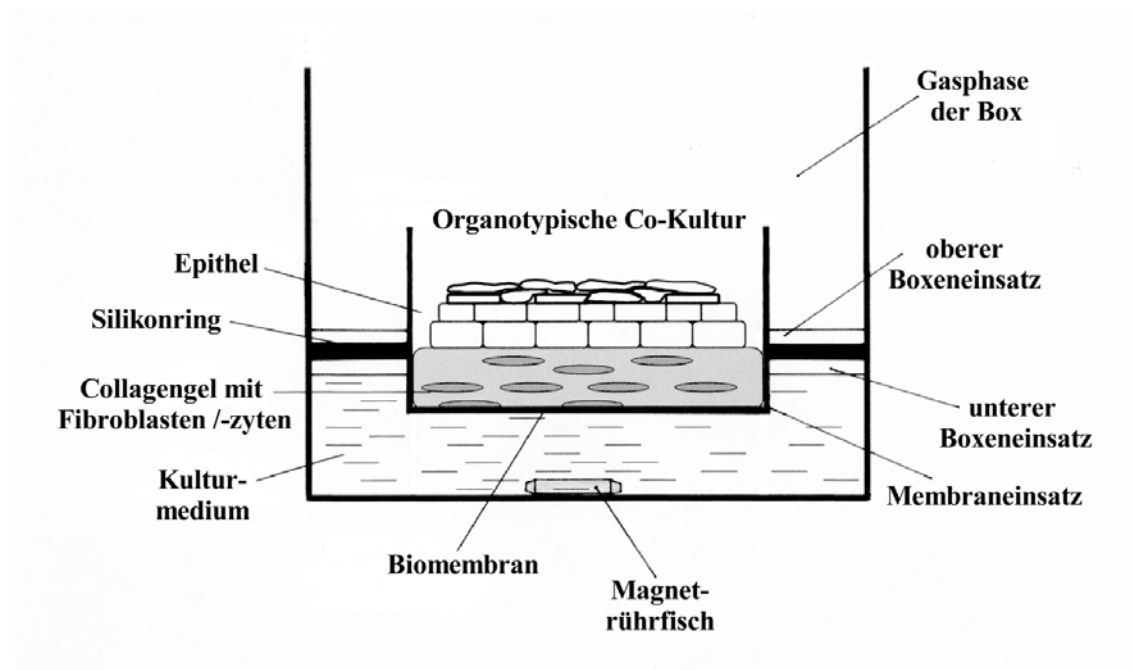


Abb. 3: Membraneinsatz mit organotypischer Co-Kultur für das Zellkultivierungssystem „Kleine Box“.

3.3.5 Dreidimensionale Zellkultivierungssysteme

In Anlehnung an das System von Minchinton (Minchinton et al. 1996; Wilson et al. 1997 und 1998) wurden zwei dreidimensionale Zellkultivierungssysteme entwickelt, die unter definierten Bedingungen die Kultivierung von Zellen über einen längeren Zeitraum auf beschichteten Membraneinsätzen erlaubten.

3.3.5.1 Zellkultivierungssystem „Kleine Box“

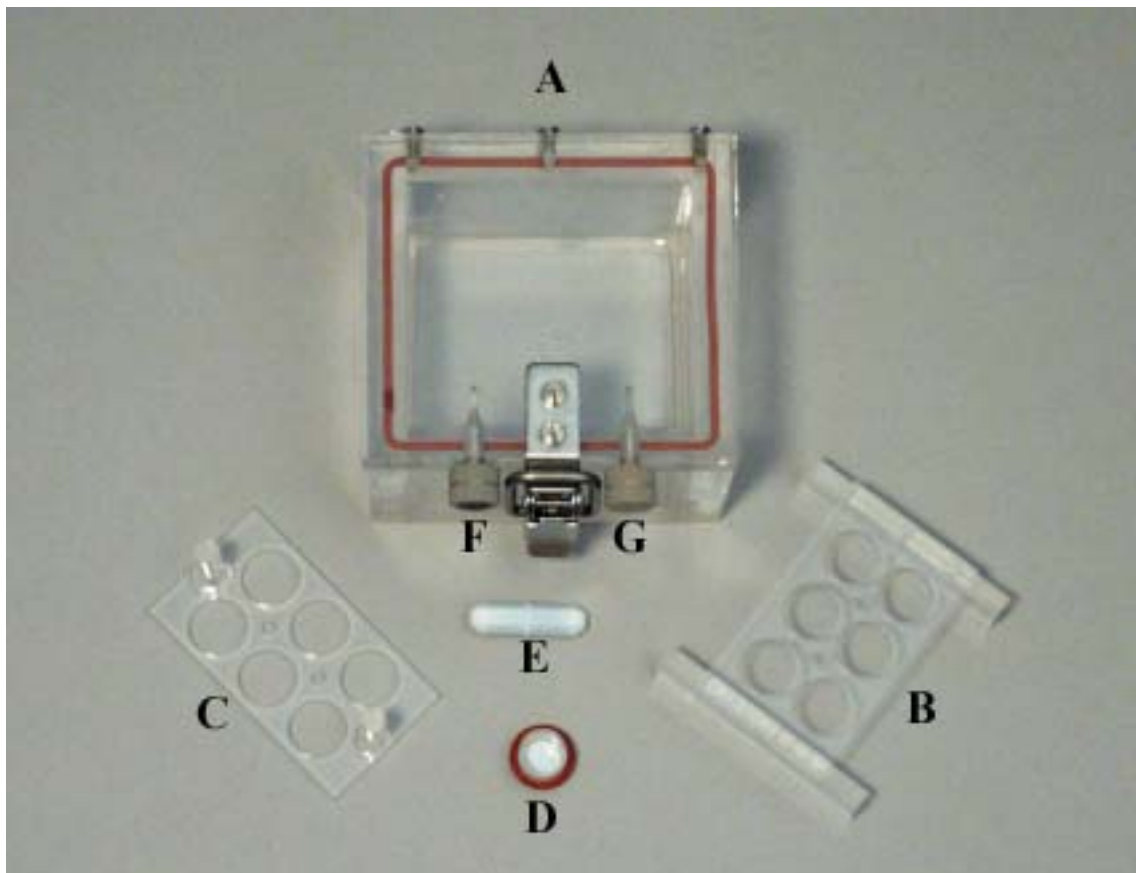


Abb. 4: Bestandteile des dreidimensionalen Zellkultivierungssystem „Kleine Box“.

Legende

- A: Gehäuse
- B, C: unterer und oberer Boxeneinsatz
- D: Membraneinsatz mit Silikonring (Ring dient der Fixierung in den Boxeneinsätzen)
- E: Magnetrührfisch
- F, G: Anschlüsse für die Begasung; F: Zuführung und G: Ableitung

Die speziellen Membraneinsätze mit den organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen mußten an der sterilen Werkbank mit autoklavierten Silikonringen (ERWE, Mainz) versehen und durch zwei Polyacrylhalterungen in der Box fixiert werden. Auf diesen Boxeneinsätzen lassen sich bis zu 6 organotypische Co-Kulturen gleichzeitig züchten. Nach Zugabe der Nährlösung bis zum Rand des unteren Acrylglaseinsatzes und dem Verschließen der Box wurde das dreidimensionale Zellkultivierungssystem in dem auf 37 °C vorgewärmten Brutschrank auf einem Magnetrührer plaziert und über Fittings (Latek, Eppelheim) an ein externes Begasungssystem angeschlossen.

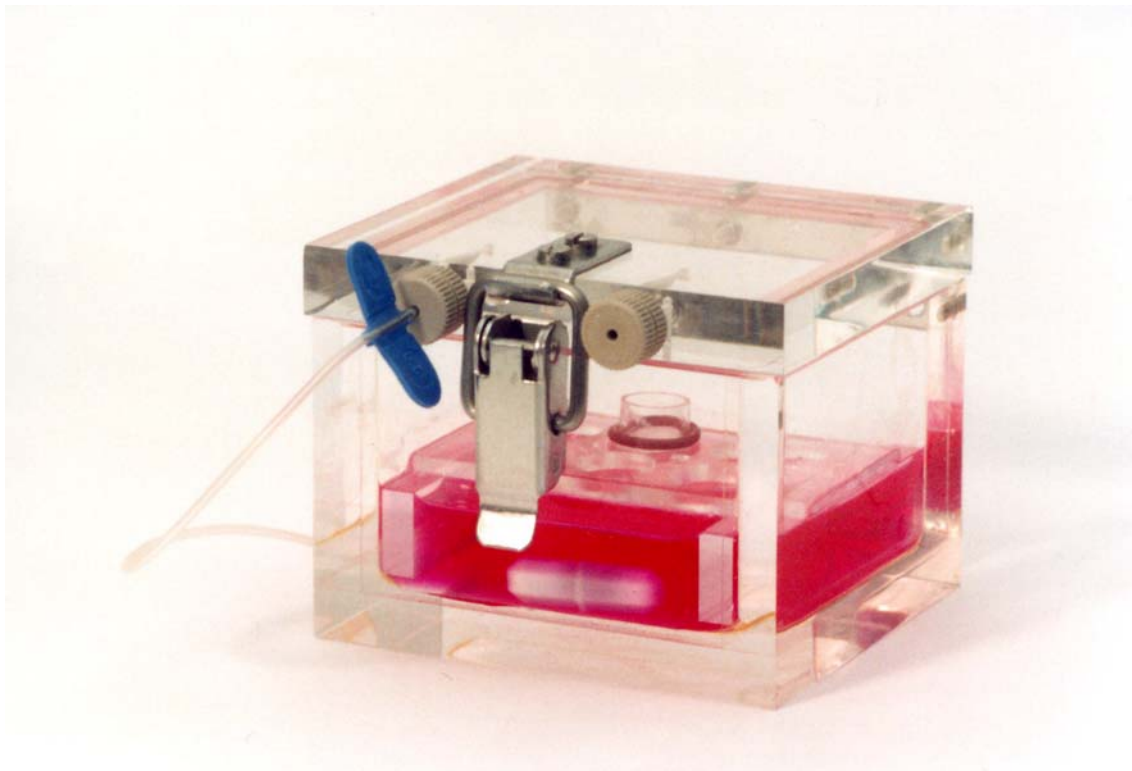


Abb. 5: Darstellung des dreidimensionalen Zellkultivierungssystem „Kleine Box“ vor Versuchsbeginn.

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, wird das System während der Kultivierung nur bis zum Rand des unteren Boxeneinsatzes mit Nährlösung gefüllt. Hieraus resultiert primär eine Phasen-Grenze zwischen der Luft bzw. dem Gasmisch und dem Kultivierungsmedium in der dreidimensionalen Box. Vergleichbare Verhältnisse herrschen auch unter physiologischen Bedingungen in der Mundhöhle.

3.3.5.2 Zellkultivierungssystem „Große Box“

Zusätzlich wurde ein System entwickelt, das die Züchtung von organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen auf speziellen Membraneinsätzen in größeren, zusammenhängenden Arealen erlaubte (siehe Abb. 6 und Abb. 7).

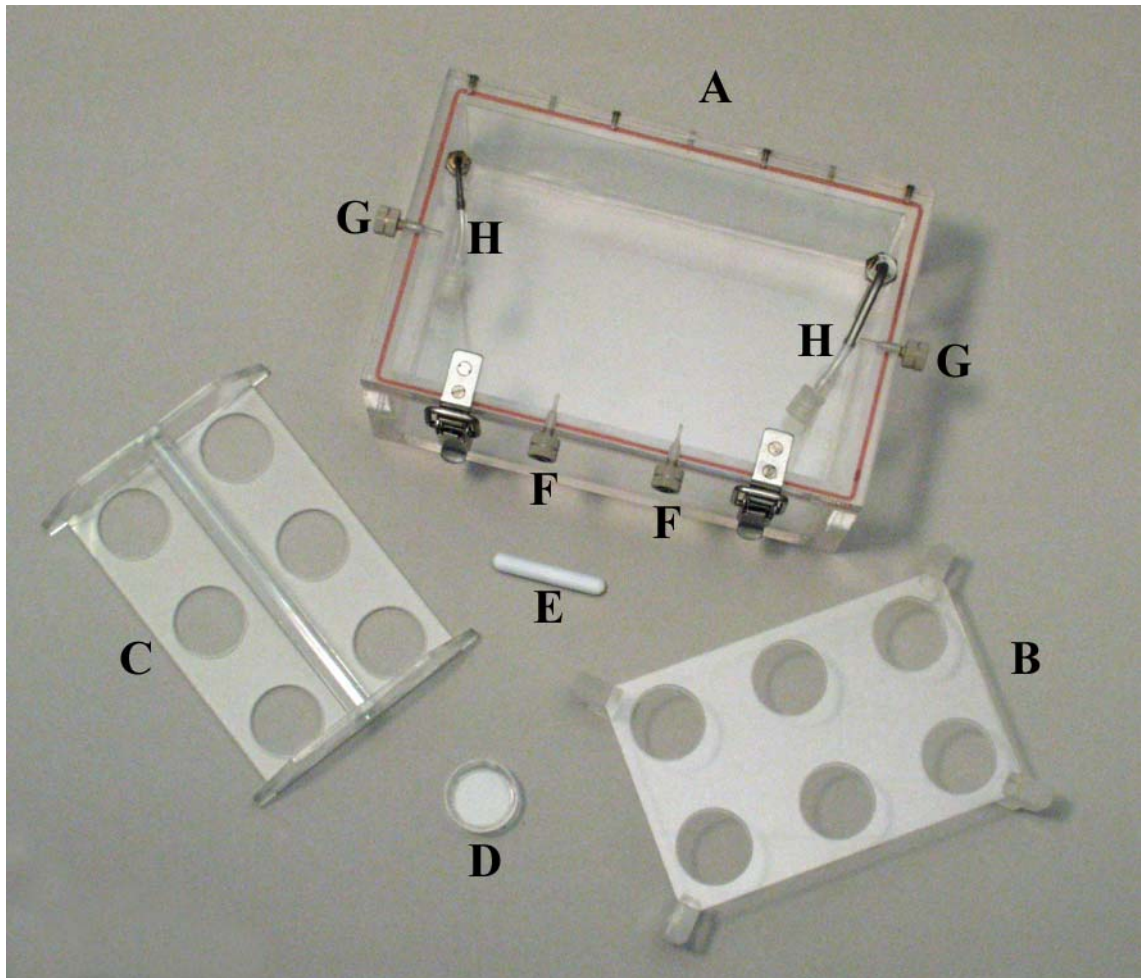


Abb. 6: Bestandteile des dreidimensionalen Zellkultivierungssystem „Große Box“.

Legende

- A: Gehäuse
- B, C: unterer und oberer Boxeneinsatz
- D: Membraneinsatz mit Silikonring (Ring dient der Fixierung in den Boxeneinsätzen)
- E: Magnetrührfisch
- F, G: Anschlüsse für die Begasung; F: Zuführung und G: Ableitung
- H: Anschlüsse für den Einsatz als Perfusionsmodell

Die Handhabung dieses dreidimensionalen Zellkultivierungssystems entsprach dem der „Kleinen Box“ mit der Ausnahme, daß aufgrund der Größe der Membraneinsätze die Fixierung mit Silikonringen nicht erforderlich war. Die verwendeten Membraneinsätze hatten einen Durchmesser von 2,5 cm, woraus sich eine freie Kulturgrundfläche von ca. 4,9 cm² ergab (rechnerisch ermittelt). Dieses dreidimensionale Zellkultivierungssystem wurde zudem mit zwei speziellen Vorrichtungen ausgestattet, die einen gleichzeitigen Einsatz als Perfusionsmodell möglich machen. Entsprechende Versuche waren aber nicht mehr Bestandteil dieser Dissertation.

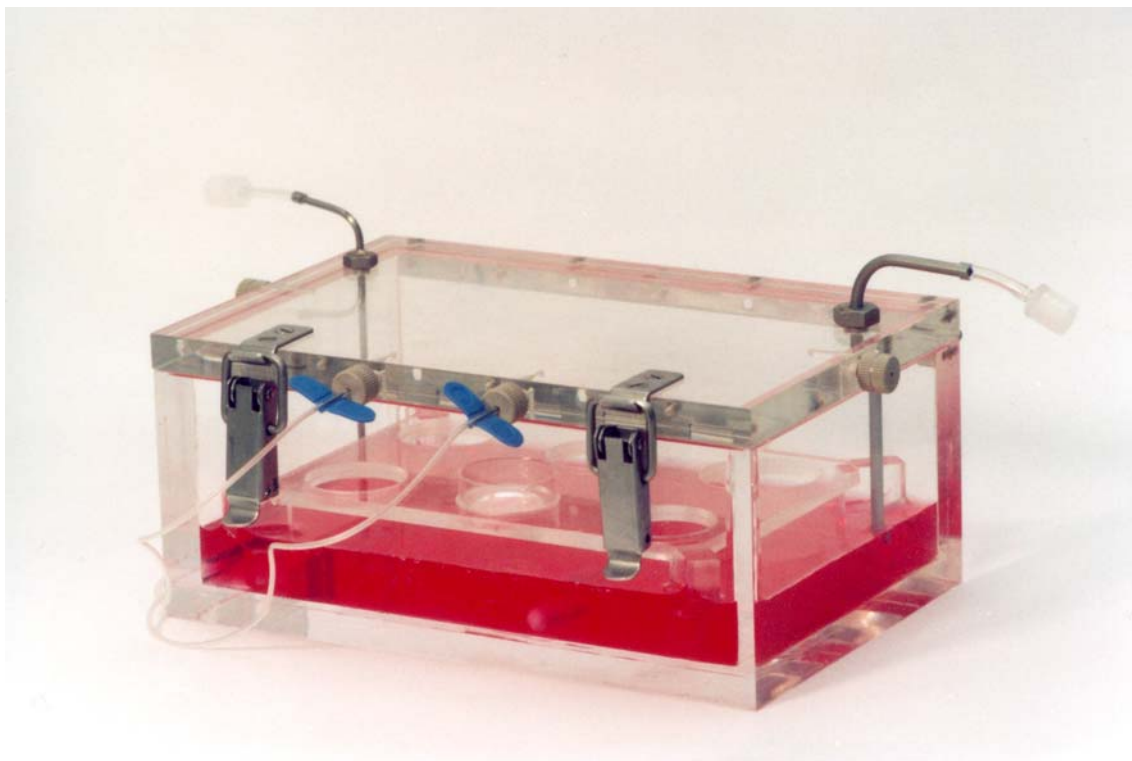


Abb. 7: Darstellung des dreidimensionalen Zellkultivierungssystem „Große Box“ im „aktivierten“ Zustand.

3.3.6 Kulturbedingungen

Mit einer Rate von 2 ml/min durchströmte ein Gasgemisch aus 90% (v/v) Stickstoff, 5% (v/v) Sauerstoff und 5% (v/v) Kohlendioxid die Kammer. Eine Äquibrierung von Gas- und Flüssigkeitsphase konnte durch permanentes Rühren (Magnetrührer, Variomag HP-System, München) erreicht werden.

Als Nährlösung wurde FAD_{komplett} verwendet, wobei ein Mediumwechsel in den beiden dreidimensionalen Zellkultivierungssystemen ab dem vierten Kultivierungstag bis zum Ende des Versuchs 2mal wöchentlich stattfand.

3.3.7 Einfrieren der organotypischen Co-Kulturen

Die Entnahme der Proben (organotypische Co-Kulturen mit ihrem Membraneinsatz) erfolgte an definierten Kultivierungstagen unter sterilen Bedingungen. Um weitere Untersuchungen (Histochemie, Immunfluoreszenz) durchführen zu können, waren die organotypischen Co-Kulturen einzufrieren und Kryoschnitte anzufertigen. Der entnommene Membraneinsatz mußte daher sowohl von der Unter- als auch von der Oberseite mit dem Einbettungsmittel Tissue Tek (Vogel, Gießen) überschichtet werden, wobei ein auf -70 °C gekühltes Metallstück als Unterlage diente. Die Gewebeproben verblieben für mindestens 1 h bei -70 °C und konnten anschließend weiterverarbeitet werden oder alternativ bei gleicher Temperatur gelagert werden.

3.3.8 Reinigung der dreidimensionalen Zellkultivierungssysteme

Da die entwickelten Zellkultivierungssysteme (d. h. die Boxen sowie deren Einsätze) aus Gründen der Transparenz aus Acrylglas gefertigt wurden, durften sie nicht mit den herkömmlichen Steriltechniken (Autoklavieren, Heißluftsterilisieren) keimfrei gemacht werden. Es mußte daher ein neues Reinigungskonzept entwickelt werden, das eine hinreichende Sterilität der Zellkultivierungssysteme gewährleistete. Im Detail wurden die Boxen bzw. ihre Einsätze für 48 h in einer konzentrierten Lauge aus Spülmittel („Citro“; Luhns, Wuppertal) gegeben und anschließend unter fließenden, heißem Leitungswasser so lange gereinigt, bis keine Rückstände des Detergens mehr sichtbar waren. Durch nachfolgendes intensives Wässern mit destilliertem Wasser ließen sich Kalk und andere Rückstände (z. B. Salze) sehr gut entfernen. Die einzelnen Bestandteile der beiden Boxen wurden auf der sterilen Werkbank über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte der Zusammenbau des Zellkultivierungssystems, das sorgfältig mit Aluminiumfolie verpackt wurde. Es folgte eine abschließende 72stündige Inkubation in dem auf 75 °C vorgeheizten Trockenschrank.

Die Anschlüsse der Boxen für das Begasungssystem („Fittings“) wurden mit 70%igem Ethylalkohol sorgfältig gereinigt und auf der sterilen Werkbank getrocknet. Bei den Begasungsschläuchen und den dazugehörigen Adaptern handelte es sich um sterile Einmalartikel eines herkömmlichen Blutentnahmesystems „Butterfly“ (Braun, Melsungen). Sie wurden nach Versuchsende vorschriftsmäßig entsorgt und bei Versuchsbeginn durch neues Material ersetzt.

Die Reinigung der Magnetrührfische und Silikonringe („Kleine Box“) erfolgte in zwei Arbeitsschritten. Zunächst wurden die Bestandteile in 70%igen Ethanol sorgfältig gespült und abschließend durch Autoklavieren (120 °C, 20 Minuten) keimfrei gemacht.

3.4 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die bei –70 °C konservierten organotypischen Co-Kulturen wurden bereits am Vortag bei –20 °C deponiert. Um Gefrierschnitte anfertigen zu können, mußte zunächst das gezüchtete Gewebematerial aus dem Membraneinsatz herausgelöst werden. Dies geschah durch Ausstanzen unter Verwendung eines Korkbohrers (Fisher Scientific, Nidderau). Die ausgestanzten Präparate wurden anschließend hochkant mit einer geringen Menge des Einbettungsmittels Tissue Tek in der Mitte der Objekthalterhülse (Slee, Mainz) fixiert und für 30 min bei –25 °C im Kryostaten (Slee, Mainz) äquilibriert. Die danach angefertigten Gefrierschnitte hatten eine Dicke von 10 µm und wurden zentral auf einen Objektträger (Superfrost, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Für die nachfolgenden Untersuchungen fanden nach einer Bewertung im Mikroskop lediglich die besten Gewebeschnitte Verwendung.

Um eine Vergleichskontrolle zu haben, waren Gefrierschnitte gleicher Dicke aus humanen Mundschleimhaut-Biopsien anzufertigen. Das Nativmaterial wurde zunächst in PBS-Puffer so lange gewaschen, bis jegliche Reste des Indikators Phenolrot aus der Nährlösung entfernt waren. Um die Gewebeprobe optimal auszurichten, wurde Naturkork (Baumarkt) als Gefrierunterlage verwendet. Das Einfrieren des Humangewebes mußte sehr schonend erfolgen, damit der locker strukturierte Gewebeverband keinen Schaden nahm. Zu diesem Zweck wurde das humane Nativpräparat komplett mit dem Einbettungsmittel Tissue Tek überschichtet und über „vorgekühltem“ Isoamylalkohol (Sigma, Deisenhofen) langsam eingefroren.

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Gefrierschnitte mindestens 48 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Um eine immunhistologische Charakterisierung durchzuführen, mußten die 10 µm dicken Gewebeschnitte zusätzlich mit Aceton (Roth, Karlsruhe) 20 min fixiert und für weitere 2 Tage bei Raumtemperatur luftgetrocknet werden.

3.5 Histologische Charakterisierung

3.5.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Zur Beurteilung des morphologischen Gesamtbildes des *in vitro* gezüchteten organotypischen Co-Kulturen wurde die Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H/E-Färbung) eingesetzt. Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden kurz in destilliertem Wasser und Leitungswasser gespült und anschließend 1 min in MAYER's saurem Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) angefärbt. Dieser Kernfarbstoff reagiert aufgrund seines basischen Charakters mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Desoxynukleinsäure des Zellkerns (Chromatin) zu einem blau-violetten Farbkomplex. Die nachfolgende 5minütige Inkubation in warmen Leitungswasser diente dem Fixieren des verwendeten Farbstoffs (Bläuen). Anschließend mußte mit destilliertem Wasser gespült werden, um vorhandene Kalkrückstände des Leitungswassers zu entfernen und um einen neutralen pH-Wert einzustellen. Zur Kontrastierung des Cytoplasmas gegen den gefärbten Kern wurde in einem zweiten Schritt der in die Fluorescein-Gruppe gehörende Farbstoff Eosin (Merck, Darmstadt, Rezept siehe 7.3) verwendet. Aufgrund seines schwach sauren Charakters ist Eosin in der Lage, mit basischen Strukturen des Plasmas eine chemische Verbindung einzugehen und einen roten Farbkomplex zu bilden. Die Inkubationszeit betrug 20 Sekunden. Es schloß sich die Differenzierung der Gewebeschnitte mit HCl-Alkohol (Zusammensetzung siehe 7.3) unter ständiger mikroskopischer Kontrolle an. Um die Präparate haltbar zu machen, mußten sie zunächst entwässert werden. Dies geschah mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 70%, 80%, 96% und 100%, Roth, Karlsruhe) Nach dem Konservieren in 100%igen Alkohol (2x5 min) durchliefen die histologischen Gewebeschnitte drei Bäder mit dem Fixierungsmittel Xylol (Roth, Karlsruhe), wobei die Inkubationszeit jeweils 3

Minuten betrug. Im letzten Arbeitsschritt erfolgte das Eindeckeln mit XEM-Mount (Vogel, Gießen; Deckgläser 18x18 mm², Menzel-Gläser, Braunschweig).

3.5.2 PAS-Färbung

Mit Hilfe der PAS-Reaktion (**P**eriodic **A**cid-**S**chiff's **R**eaction) wurde in dieser Dissertation die Ausbildung einer Basalmembran lichtmikroskopisch nachgewiesen. Die Färbung beruht auf der roten Darstellung von zwei dicht gelagerten Aldehydgruppen mit Hilfe der fuchsinschwefligen Säure (SCHIFF's Reagenz, Merck, Darmstadt). Ihre Spezifität liegt in der gezielten Hydrolyse von Kohlenhydraten durch Einsatz von Perjodsäure (Sigma, Deisenhofen), wobei aus 1,2-Glykolgruppen (HOCH-CHOH) Aldehydgruppen entstehen. Der Vorteil der Perjodsäure besteht darin, daß die Reaktion bei der Bildung der Aldehyde endet, was die Entstehung von Carboxylgruppen durch weitere Oxidationsprozesse verhindert. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer charakteristischen Rotfärbung. Die einzelnen Arbeitsschritte der PAS-Färbung entstammten dem Leitfaden „Histologische Technik“ (Burck et al. 1982). Im Detail wurden die acetonfixierten Gefrierschnitte (zur Anfertigung siehe 3.4) kurz in destilliertem Wasser gespült und einer 10minütigen Hydrolyse in 0,5-0,8%iger Perjodsäure (Rezept siehe 7.3) unterzogen. Durch Waschen mit Leitungs- und destilliertem Wasser (jeweils 10 min) ließen sich Reste der Säure entfernen, wobei sich und der pH-Wert in den neutralen Bereich verlagerte. Anschließend wurden die Gefrierschnitte eine halbe Stunde mit SCHIFF's Reagenz inkubiert. Der nächste Arbeitsprozeß diente dem Fixieren der Aldehydgruppen. Dies geschah durch mehrmaliges Spülen (3x2 min) in Natriummetabisulfit (Sigma, Deisenhofen; Rezept ist im Anhang unter Punkt 7.3 aufgeführt). Die Gewebeschnitte mußten wiederum 10 min in Leitungswasser gespült werden, bevor die Kernfärbung mit MAYER's saurem Hämatoxylin erfolgte. Die nachfolgenden Arbeitsschritte umfaßten das Bläuen in Leitungswasser, das Dehydrieren unter Verwendung einer aufsteigende Alkoholreihe, das Konservieren der Präparate in reinem Ethanol sowie das abschließende Fixieren mit Xylol. Nach dem Überschichten mit XEM-Mount wurden die Gewebeschnitte mit einem Deckglas (18x18 mm²; Menzel-Gläser, Braunschweig) luftblasenfrei versiegelt und bei Raumtemperatur gelagert.

3.6 Immuncytochemische Charakterisierung

3.6.1 Allgemeine Bedeutung von Differenzierungsmarkern

Die Zelldifferenzierung, eine wichtige Voraussetzung für die Integrität eines jeden Gewebes, geht nicht nur mit morphologischen Zellveränderungen einher, sondern zeigt sich auch in der Synthese von speziellen, biochemischen Markern. So werden im Laufe dieses Prozesses neben Bestandteilen des Cytoskeletts (Cytokeratine) und des basalen Zellkompartiments auch Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und Basalmembran (BM) synthetisiert. Um die physiologische Integrität der in vitro gezüchteten humanen Mundschleimhaut zu beurteilen, waren geeignete Kriterien hinsichtlich der Zelldifferenzierung zu erarbeiten. Es wurde daher ein System immuncytochemischer Parameter zusammengestellt, das neben der Cytokeratin-expression, auch Bestandteile des Cytoskeletts und der extrazellulären Matrix enthielt. Die nachfolgende Tabelle 2 gibt einen Überblick der eingesetzten Antikörper und die Lokalisation des entsprechenden Antigens im Gewebe.

Tabelle 2: Antikörper der immuncytochemischen Charakterisierung und ihre „Wirkungsstätte“

Primärantikörper	Lokalisation im Gewebe	Basisliteratur
Cytokeratin 14, LL002	Epithel	z. B. Moll et al. 1982
Cytokeratin 4, 6B10	Epithel der Mundschleimhaut	z. B. Moll et al. 1982
Cytokeratin 13, Ks13.1	Epithel der Mundschleimhaut	z. B. Moll et al. 1982
Laminin	extrazelluläre Matrix (ECM)	z. B. Haas et al. 1994
Collagen Typ IV, 1042	ECM, Basalmembran	z. B. Yurchenco et al. 1994
Desmoglein 2	Desmosomen	z. B. Alberts et al. 1990
Desmoplakin 1&2	Desmosomen	z. B. Alberts et al. 1990
Fibronectin	Bindegewebe	z. B. Hynes 1990
Tenascin	Bindegewebe	z. B. Erickson 1993

Anm.: LL002, 6B10, Ks13.1 und 1042 beschreiben den spezifischen Klon des verwendeten Antikörpers.

3.6.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Alle immuncytochemischen Untersuchungen wurden mit der Indirekten Immunfluoreszenz (IIF) an acetonfixierten Gefrierschnitten in der feuchten Kammer durchgeführt. Das Reaktionsprinzip besteht aus dem initialen Einsatz spezifischer Antikörper (Ak) gegen ein im Gewebe bekanntes Antigen (Ag), wobei es durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion zur Bindung des Gamma-Globulins des Antikörpers im Gewebe kommt. Durch zweimaliges Spülen in einfach konzentriertem PBS-Puffer ließen sich ungebundene Antikörper-Moleküle ohne Schwierigkeiten entfernen, bevor sich dann im nächsten Reaktionsschritt ein fluorochromiertes Antiglobulinserum an den Ag-Ak-Komplex anlagerte. Die Inkubationszeiten und Konzentrationen des jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpers richteten sich nach den Empfehlungen der Hersteller (siehe hierzu die Tabellen 4 und 5). Um die Auswertung des immuncytochemisch behandelten Präparate zu erleichtern, wurde jedes Objekt einer zusätzlichen Kontrastfärbung unterzogen. Die Gewebeschnitte wurden mit der DAPI-Lösung (Herstellungsprotokoll siehe 7.3) 15 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt (Russell et al. 1975), mit PBS-Puffer gewaschen und in der DABCO-Lösung (Rezeptur siehe 7.3) als „Antifading“-Agens nach einer Inkubationszeit von 5 bis 10 Minuten unter einem Deckglas eingebettet (Baskin et al. 1992; Longin et al. 1993). Das abschließende Versiegeln mit handelsüblichen Klarlack (Jade, Düsseldorf) sollte ein Austrocknen der Präparate verhindern. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen) unter UV-Anregung (Filtersatz 02, Zeiss, Oberkochen).

Auswertungsmodus der indirekten Immunfluoreszenz

Um die immuncytochemisch behandelten Gewebepräparate objektiv auszuwerten, bedurfte es eines geeigneten Beurteilungssystem. Es wurde daher physiologisch-intakte Mundschleimhaut parallel aufgearbeitet und einer entsprechenden immuncytochemischen Behandlung unterzogen, wobei die Intensität der Fluoreszenz als Grundlage für das Bewertungssystem diente. Die resultierende Beurteilungsskala gestaltete sich gemäß Tabelle 3.

Tabelle 3: Klassifizierung der Färbeintensität der indirekten Immunfluoreszenz

Beurteilungsskala	Subjektive Beurteilung
Ø	keine Fluoreszenz
+	schwache Fluoreszenz
++	starke Fluoreszenz
+++	sehr intensive Fluoreszenz

3.6.3 Nachweis von Komponenten des Cytoskeletts

Das Cytoskeletts besteht aus einer Vielzahl von Komponenten, u.a. aus den Intermediärfilamenten. Zu dieser Gruppe gehören neben dem universalen Epithelmarker Cytokeratin 14 (Maus, Novocastra, Hamburg) auch die frühen Differenzierungsmarker Cytokeratin 4 und Cytokeratin 13 (Maus; Progen, Heidelberg), deren Expression mit der IIF nachgewiesen wurde. Als weitere Untersuchungsparameter waren die desmosomalen Vertreter Desmoglein 2 (Maus; Progen, Heidelberg) und Desmoplakin 1 und 2 (Maus; Progen, Heidelberg) von gesteigertem Interesse. Bei den hier eingesetzten Antikörpern handelte es mit der Ausnahme von Desmoplakin 1 und 2 um monoklonale Antikörper. Als Sekundärantikörper fungierte IgG-Cy3-gekoppelt (Maus; Sigma, Deisenhofen). Die verwendeten Arbeitsverdünnungen, als Verdünnungsmittel diente einfach konzentrierter PBS-Puffer (Rezept siehe 7.4), sowie die Inkubationszeiten nebst Inkubationstemperaturen (RT: Raumtemperatur) wurden im nachfolgenden tabellarisch aufgelistet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht der IIF-Antikörper für den Nachweis der Bestandteile des Cytoskeletts

Primärantikörper	Arbeitsverdünnung	Inkubationszeit	Temperatur
Cytokeratin 14 Klon LL002	1:5	1h	RT
Cytokeratin 4 Klon 6B 10	1:5	über Nacht	4 °C
Cytokeratin 13 Klon Ks 13.1	gebrauchsfertig	1 h	RT
Desmoglein 2	gebrauchsfertig	1 h	RT
Desmoplakin 1 und 2	gebrauchsfertig	1 h	RT
Sekundärantikörper	Arbeitsverdünnung	Inkubationszeit	Temperatur
Anti IgG-Cy3 gekoppelt	1:100	45 min	RT

3.6.4 Nachweis von Produkten der extrazellulären Matrix (ECM)

Die ECM setzt sich aus einer Vielzahl von molekularen Strukturen zusammen. Es mußte daher im Vorfeld eine Vorauswahl getroffen werden, die eine einwandfreie Charakterisierung des gezüchteten Gewebes hinsichtlich des physiologischen Status erlaubte. Im einzelnen wurden das Adhäsions-Glycoprotein Fibronectin (Maus; Progen, Heidelberg), Tenascin (Maus, Progen, Heidelberg) sowie die Hauptbestandteile der Basalmembran, Collagen IV (Maus; Progen, Heidelberg) und Laminin (Kaninchen; Progen, Heidelberg), immuncytochemisch nachgewiesen. Während bei den ersten drei genannten Primärantikörper wiederum IgG-Cy3-gekoppelt (siehe 3.6.3) als Sekundärantikörper fungierte, wurde bei dem Nachweis von Laminin IgG-FITC-gekoppelt (Kaninchen; Sigma, Deisenhofen) als sekundärer Färbepartner eingesetzt. Die Auflistung der Antikörpereigenschaften und Reaktionsbedingungen erfolgte wiederum in tabellarischer Form (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete Antikörper zum immuncytochemischen Nachweis von ECM-Produkten

Primärantikörper	Arbeitsverdünnung	Inkubationszeit	Temperatur
Collagen Type IV Klon 1042	1:5	1 h	RT
Laminin	1:50	über Nacht	4 °C
Fibronectin	1:5	1 h	RT
Tenascin	1.5	1 h	RT
Sekundärantikörper	Arbeitsverdünnung	Inkubationszeit	Temperatur
Anti IgG-Cy3 gekoppelt	1:100	45 min	RT
Anti IgG-FITC gekoppelt	1:100	1 h	RT

3.7 Mutationsanalyse von Tumorsuppressorgen p53

3.7.1 RNA-Präparation und Isolierung

Um genetische Alterationen des Tumorsuppressorgens p53 nachzuweisen, mußte die betreffende RNA aus dem Humanmaterial isoliert und identifiziert werden. Die Extraktion erfolgte mit dem RNeasy-Mini-Kit (QIAGEN, Hilden,) in Anlehnung an das dazugehörige Arbeitsprotokoll „*Rneasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues*“ (1997). Das verwendete Testsystem erlaubte die Isolierung aller RNA-Moleküle, die mehr als 200 Nukleotide besitzen, und setzte sich aus den in Tabelle 6 aufgelisteten Komponenten zusammen.

Tabelle 6: Komponenten des RNeasy Mini Kits (QIAGEN, Hilden)

Komponente	Bemerkungen
RLT-Puffer	Lyse-Puffer; vor Gebrauch mit 1% (v/v) 14.5 M β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe) zu versetzen
QIAshredder-Säule	Zerstörung (Scherung) der genomischen DNA
RNeasy Mini-Säule	Adsorption (Bindung) der RNA
RW1-Puffer	Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration; gebrauchsfertig
RPE-Puffer	Waschpuffer mit niedriger Salzkonzentration; vor Gebrauch mit 4 Volumenanteilen 100% Ethanol zu versetzen
RNase-freies Wasser	gebrauchsfertig

Die RNA-Extraktion erfolgte sowohl mit den isolierten Epithel- und Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut (jeweils 5 Millionen Zellen) als auch mit dem betreffenden Nativmaterial (100 Gefrierschnitte á 20 μ m), das als interne Vergleichskontrolle eingesetzt wurde. Im ersten Arbeitsschritt mußten dem Zell- bzw. Gewebematerial 350 μ l RLT-Puffer zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren oder

Vortexen so lange gemischt werden, bis keine Zellaggregate mehr sichtbar waren. Dieser stark denaturierende Guanidinium-Isothiocyant (GITC)-Puffer führte zur Lyse der Zellen und inaktivierte zusätzlich die vorhandenen RNasen. Hiernach erfolgte die Separation von RNA und genomischer DNA aus dem Homogenisat. Zu diesem Zweck wurde das komplette Lysat auf die QIAshredder-Säule gegeben und bei 15000 rpm 2 Minuten zentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus, Hanau). Die im Überstand befindliche RNA wurde durch Zusatz von 350 µl 70%igen Ethanol (RNase-frei) gefällt. Nach der Übertragung des Gemisches auf eine RNeasy Mini-Säule schloß sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an (10000 rpm, 1 min), während dessen die RNA an die Kieselgel-Membran der Säule adsorbierte. Das Eluat wurde verworfen und die Säule auf einem neuen Reaktionsgefäß plaziert. Ein Aufreinigen der RNA erfolgte durch die Verwendung von zwei Pufferlösungen unterschiedlicher Salzkonzentrationen. Zunächst wurde die Säule 700 µl RW1-Puffer überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (1 min bei 10000 rpm) wurde das Eluat abermals verworfen und die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Es folgte ein weitere Aufreinigung der RNA, indem die Säule zweimal mit 500 µl RPE-Puffer versetzt und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert wurde. Um sicherzustellen, daß alle alkoholhaltigen Rückstände entfernt und die Kieselgel-Membran vollständig getrocknet waren, erfolgte eine erneute Zentrifugation von 2 min mit 15000 rpm. Die RNeasy Mini-Säule wurde dann auf einem zuvor autoklavierten 1.5 ml Reaktionsgefäß (Safe-lock, Eppendorf, Hamburg) plaziert und mit 40 µl RNase-freiem Wasser versetzt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 1 min mit 10000 rpm erfolgte schließlich die Elution der RNA, deren Lagerung bei -20 °C erfolgte.

3.7.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht der Wellenlänge 250-270 nm und haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Mittels dieser Eigenschaft kann die Konzentration der RNA in wäßriger Lösung auf einfache Art und Weise bestimmt werden.

Bei 260 nm und einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm beträgt die Konzentration an Polynukleotiden bei einer Absorption von 1:

ds DNA = 50 µg/ml

ss DNA = 40 µg/ml

ss RNA = 40 µg/ml

Oligos = 25 µg/ml

Da Proteine aufgrund ihrer aromatischen Aminosäuren ebenfalls im UV-Licht absorbieren (280 nm), läßt sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm die relative Reinheit der RNA-Lösung abschätzen. Ein Quotient aus den Absorptionen bei 260nm und 280 nm von über 1,7 wird als hinreichend für eine reine RNA-Lösung angesehen.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden nach dem photometrischen Nullabgleich 10 µl der extrahierten RNA-Probe in einer Quarz-Küvette mit 490 µl RNase-freies DEPC-Wasser (Sigma, Deisenhofen; Rezept siehe 7.3) gemischt. Hieran schloß sich die Bestimmung der Absorption dieser Lösung bei 260 und 280 nm mit einem Spectrophotometer (Lambda Bio UV-Vis, Perkin Elmer, Weiterstadt) an. Es erfolgte abschließend die Umrechnung des erhaltenen Werts auf die Ausgangslösung gemäß der nachfolgenden Formel:

$$\text{RNA}_{\text{Total}} = A_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times 50$$

(A_{260} : Adsorption bei 260 nm, 40 µg/ml: RNA-Konstante, 50: Verdünnungsfaktor).

3.7.3 Synthese der cDNA (Reverse Transkription)

Für die weiteren Untersuchungen wurde die isolierte RNA in die cDNA umgeschrieben. Prinzipiell hybridisiert man einen Primer (hier: Random Hexamers, Gentech, Mainz) an die RNA-Matrize und erstellt mit der Reversen Transkriptase (MuLV, Perkin Elmer, Weiterstadt) die entsprechende DNA-Kopie.

Im einzelnen wurden im primären Reaktionsschritt 1 µg RNA und Random Hexamers (Konzentration 50 pM) zu einem Reaktionsvolumen von 11 µl vermischt. Hieran schloß sich die Inkubation dieses Gemisches für 15 Minuten in einem Heizblock (Test tube heater SHT 2D, Stuart Scientific, GB) bei 65 °C an, um eventuell gebildete Dimere und

Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Ein Abstoppen der Reaktion wurde durch 5minütige Inkubation bei 0°C (auf Eis) erreicht. Nach Zugabe des Mastermixes (siehe Tabelle 7) mußte das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei 40°C zu Überführung der RNA in die cDNA inkubiert werden. Zur Beendigung der reversen Transkription diente eine 5minütige Inkubation bei einer Temperatur von 99 °C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 7: Mastermix für **einen Reaktionsansatz** der reversen Transkription

Komponente	Konzentration	Volumen [µl]
10x PCR-Puffer (Perkin Elmer, Mannheim)	1x	3
50 mM MgCl ₂ (Perkin Elmer, Weiterstadt)	5 mM	6
RNase-freies Wasser (QIAGEN, Hilden)	----	3
dNTPs (Nukleotide, Promega, Mannheim)	1 mM	3
RNasin (RNase-Inhibitor, Promega, Mannheim)	1 U/µl	1
MuLV (Perkin Elmer, Mannheim)	5 U/µl	3
Endvolumen		19

3.7.4 DNA-Primer von p53

Um DNA mit Hilfe einer PCR zu amplifizieren, werden spezifische Oligonukleotid-Primer (Amplimer) benötigt. Hierbei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (template) sind. Für die Untersuchung der Mutation von Tumorsuppressorgen p53 wurden vier unterschiedliche Primerpaare eingesetzt, die sich jeweils aus einem Forward-Primer (Leserichtung: 5'⇒3') und einem Reverse-Primer (Leserichtung: 3'⇒5') konzipierten (siehe Tabelle 8). Die verwendeten Amplimer berücksichtigen die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Mutationsloci (z. B.: Sjögren et al. 1996). Eine kurze Charakterisierung der verwendeten Primerpaare erfolgte in Tabelle 8. Die kompletten Primersequenzen und ihre exakte Lokalisation auf der cDNA des p53-Gens wurden dem Anhang unter Kapitel 7.1 zugefügt.

Tabelle 8: Charakterisierung der verwendeten p53-Primer (Sjögren et al. 1996)

Primer-Paar	Lokalisation der Primer auf dem p53-Gen	Fragment [Bp]
1	Beginn der Exons 2, 3 und 4, Teile von Exon 1 und 5	448
2	Beginn der Exons 5 und 6, Teile von Exon 4 und 7	364
3	Beginn der Exons 6, 7, 8 und 9, Teile von Exon 6 und 10	477
4	Beginn der Exons 9, 10 u. 11, Teil von Exons 8	431

3.7.5 Amplifikation der p53-Fragmente mittels PCR

Die Amplifikation der verschiedenen, spezifischen p53-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierbei handelt es sich um eine enzymatische Vermehrung eines speziellen DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Diese Primer werden unter Hybridisierungsbedingungen im Überschuß zur DNA gegeben. Die DNA-Polymerase verlängert in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen, die am Ende der Reaktion wieder als Doppelstränge vorliegen. Für eine Wiederholung der Synthese muß die DNA daher erneut denaturiert werden. Dann folgt eine neue Runde mit der Hybridisierung von Oligonukleotid-Primern und DNA-Strangsynthesen. In den folgenden Zyklen dienen auch die de novo synthetisierten DNA-Stränge als Matrize und tragen dazu bei, die Konzentration der vervielfältigten Ziel-Sequenzen zu steigern (siehe Abb. 8).

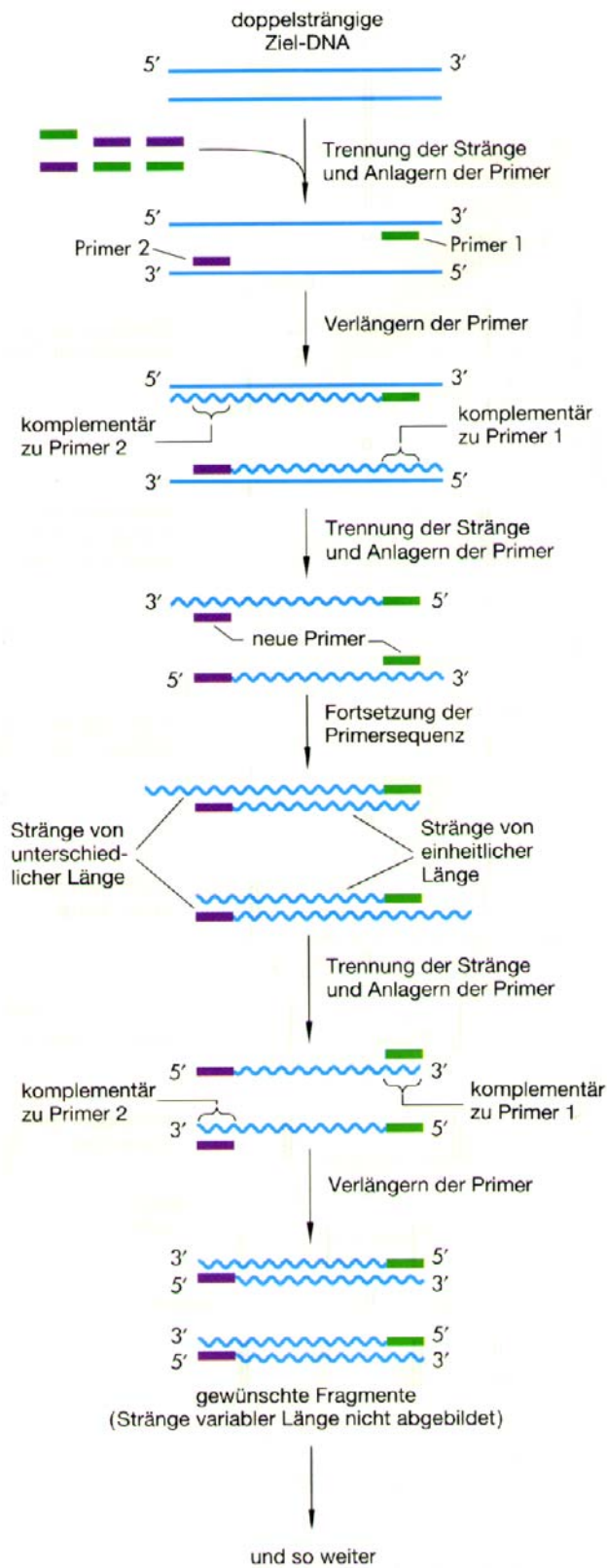


Abb. 8: PCR-Schema nach J. D. Watson (1993).

Ihre Kopienzahl (K_Z) läßt sich nach Abschluß der Reaktion gemäß der folgenden Gleichung ermitteln:

$$K_Z = (2^n - 2n)x$$

dabei bedeutet

n = Anzahl der Vermehrungszyklen

$2n$ = Produkte des 1. und 2. Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist

x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier unterschiedliche p53-Genprodukte (siehe 3.7.4) mit der PCR gemäß dem Pipettierschema von Tabelle 9 unter Verwendung eines Thermocyclers (T-Personal 48, Biometra, Göttingen) amplifiziert.

Tabelle 9: PCR-Reaktionsansatz für ein Primerpaar des Tumorsuppressorgens p53

Komponente	Konzentration	Volumen [μl]
10x PCR-Puffer (Genecraft, Münster)	1x	2,50
25 mM MgCl ₂ (Genecraft, Münster)	2,5 mM	2,50
RNase-freies Wasser (QIAGEN, Hilden)		12,75
10 mM dNTPs (Promega, Mannheim)	0,2 mM	0,50
Forward Primer (Gentech, Mainz)	10 pM/ μ l	1,00
Reverse Primer (Gentech, Mainz)	10 pM/ μ l	1,00
TaqPolymerase (Genecraft, Münster)	5 U/ μ l	0,25
Isolierte cDNA		5,00
Endvolumen		25,00

In einem initialen Reaktionsschritt erfolgte durch 5minütige Inkubation bei 95 °C die Aktivierung der TaqPolymerase. Die Doppelstränge der cDNA wurden durch Erhitzen (45 s bei 94 °C) des Reaktionsgemisches getrennt (Denaturierung) und dann auf 60 °C abgekühlt, so daß beide Primer (Forward- und Reverse-Primer) sich an die beiden Primer-Bindungsstellen an der Zielregion anlagern konnten. Die Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotide war nach 45 Sekunden abgeschlossen. Im nächsten Reaktionsschritt synthetisierte die TaqPolymerase unter Verbrauch von Nukleotiden komplementär zur Matrize neue DNA-Stränge. Um diesen auch als Extension bezeichneten Prozeß erfolgreich durchzuführen, mußte der Reaktionsansatz 1 min bei 72 °C inkubiert werden. Vor dem nächsten Zyklus erfolgte die Separation der de novo synthetisierten DNA-Doppelstränge durch Denaturierung, gefolgt von Annealing und Extension. Die PCR wurde nach 38 Zyklen durch eine einmalige Inkubation von 5 Minuten bei 72 °C beendet.

3.7.6 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach der Größe (Maniatis et. al. 1982). Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandern die Nukleinsäuren umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekülgröße in der festen Gelmatrix der Agarose von der Kathode zur Anode. Die Agarose-Gelelektrophorese wird analytisch oder präparativ zur Reinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Durch Veränderung der Agarosekonzentration kann der Trennbereich der Nukleinsäure-Fragmente variabel eingestellt werden. Durch das Mitführen eines Größenstandards lassen sich die Molekulargewichte der DNA-Fragmente abschätzen. Die Detektion der Nukleinsäurebanden im Gel erfolgt mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid, der bei Anregung mit UV-Licht orangefarben fluoresziert.

In dieser Arbeit wurde eine 1,8% (w/v) Agarose (Roth, Karlsruhe) in TBE-Puffer (Zusammensetzung siehe 7.3) durch Aufkochen (Mikrowelle VIP 34, Whirlpool, GB) gelöst, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Zu 100 ml dieser Lösung fügte man 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/dl Sigma, Deisenhofen) hinzu, füllte nach kurzer Abkühlungsphase die Gellösung in die mit Tesafilm abgedichtete Gelapparatur (17,5 cm x 22,5 cm; Roth, Karlsruhe) und setzte einen Kamm ein, um die Probenfächer zu

bilden. Nach 1 h wurde das auspolymerisierte Gel in eine Elektrophoresekammer (Compact Midi, Roth, Karlsruhe) gelegt, die mit TBE-Puffer angefüllt war. Der komplette PCR-Ansatz (25 µl) wurde mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt und in die freien Geltaschen pipettiert. Zusätzlich pipettierte man in zwei freie Taschen des Gels jeweils 1 µg DNA des 100 Bp- und 200 Bp-Markers, der ebenfalls mit dem Laufpuffer versetzt wurde (5 µl Marker + 3 µl Auftragspuffer), um die Molekulargewichte der amplifizierten p53-Produkte annähernd zu bestimmen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V und einer Laufzeit von 2 h (EPS 600, Pharmacia, Uppsala, S). Abschließend wurde das Bandenmuster auf dem Transilluminator (UVP TM-15, Ultraviolet Products, Cambridge, GB) bei einer Wellenlänge von 254 nm mittels einer CCD-Kamera mit Orange-Rot-Filter (Intas, Göttingen) sichtbar gemacht.

3.7.7 Isolierung der p53-Fragmentbanden im Agarose-Gel

Anhand der eingesetzten DNA-Größenstandards ließen sich die gewünschten p53-Genprodukte spezifisch nachweisen. Mit dem Skalpell wurden die vier Banden der Genfragmente entsprechend ihrer Größe von 448 Bp, 364 Bp, 477 Bp sowie 431 Bp unter dem UV-Licht aus dem Gel entfernt und in 2,0 ml Reaktionsgefäßen (Safe-lock, Eppendorf, Hamburg) gesichert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.7.7.1 Präparative DNA-Isolierung für SSCP-Mutationsanalyse

Die präparative Isolierung der amplifizierten p53-Genfragmente aus dem Agarose-Gel für die SSCP-(Single-strand Conformation Polymorphism)-Mutationsanalyse wurde von Prof. Dr. W. Hennig im Institut für physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Gentech) durchgeführt. Prinzipiell erfolgte im ersten Reaktionsschritt die Adsorption der cDNA an eine spezielle Matrix (hier: „Worthionton“-Säule). Durch einen nachfolgenden Zentrifugationsschritt ließen sich Verunreinigungen auf einfache Art und Weise abtrennen, bevor die DNA abschließend mit 0,1 M KCl-Lösung von der Säule eluiert wurde. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

3.7.7.2 Präparative DNA-Isolierung für Sequenzierung

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) und dem dazugehörige Arbeitsprotokoll „*QIAquick™ Spin Handbook*“ (1999). Das verwendete Testsystem erlaubte die Extraktion sowie die Aufreinigung der DNA mit einem Molekulargewicht von 70 Bp bis 10 kBp und setzte sich aus den in Tabelle 10 aufgeführten Bestandteilen zusammen.

Tabelle 10: Verwendete Bestandteile des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden)

Komponente	Bemerkungen
QG-Puffer	Solubilisierungspuffer; gebrauchsfertig
QIAquick-Säule	Adsorption der genomischen DNA
PE-Puffer	Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration; vor Gebrauch mit 45 ml 100% (v/v) Ethanol (Roth, Karlsruhe) zu versetzen

Der ausgeschnittenen DNA-haltigen Agarose wurden pro 100 mg Gel 300 µl des Solubilisierungspuffers QG-Puffer zugegeben. Nach Mischen des Probenansatzes erfolgte eine 10minütige Inkubation bei 50 °C im Heizblock, um die Agarose zu verflüssigen. Hiernach fällte man durch Zugabe von 1 Volumenanteil 100% (v/v) Isopropanol (Roth, Karlsruhe) die DNA. Das Reaktionsgemisch wurde im nächsten Reaktionsschritt auf die QIAquick-Säule (maximales Fassungsvermögen: 800 µl) pipettiert und 1 min mit 13000 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, während dessen die DNA an die Silikatgel-Membran adsorbierte. Durch erneute Zugabe des QG-Puffers (500 µl) und 1 minütige Zentrifugation mit 13000 rpm (RT) ließen sich jegliche Reste der Agarose aus dem Reaktionsansatz entfernen. Das Aufreinigen der DNA erfolgte durch Waschen mit dem PE-Puffer. Es wurden daher 750 µl dieser Pufferlösung auf die Säule gegeben und wie gewohnt zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT). Nach Verwerfen des Überstandes mußte erneut resuspendiert und zentrifugiert werden, um jegliche Ethanolreste des Puffers zu entfernen, welche die Ausbeute der DNA empfindlich beeinflussen. Im abschließenden Reaktionsschritt wurde die QIAquick-Säule auf ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß plaziert und die Membran

zentral mit 50 µl RNase-freien Wassers benetzt. Die Elution der DNA erfolgte durch 1minütige Zentrifugation mit 13000 rpm bei Raumtemperatur. Das aufgereinigte Material wurde bei –20 °C eingefroren und für die Sequenzierungsanalysen dem Institut für Genetik (GENTERprise) der Johannes Gutenberg Universität in Mainz übergeben.

3.7.8 SSCP-Mutationsanalyse der p53-Fragmente

Die PCR-SSCP-Analyse (Polymerase Chain-Reaction-Single-strand Conformation Polymorphism Analysis) ist eine schnelle und effiziente Methode zur Detektion von Mutationen und Polymorphismen in genomischer DNA oder wie hier cDNA-Sequenzen. Prinzipiell wird die Zielsequenz mittels PCR amplifiziert, wobei die verwendeten Primer in der Regel mit einem Fluorochrom gelabelt sind. Die erhaltenen Reaktionsprodukte werden nach der Denaturierung einer Gelelektrophorese unterzogen. Man erhält ein sogenanntes Fluorogramm der DNA-Einzelstränge, das eventuelle Mutationen direkt aufzeigt (Verschiebung des Größenpeaks, Auftreten/Verlust von mehreren Peaks unterschiedlicher Größe). Diese Veränderungen im Laufverhalten beruhen häufig auf einer Konformationsänderung der einzelsträngigen Amplifikationsprodukte.

Die SSCP-Mutationsanalysen wurden von Professor Dr. Wolfgang Hennig am Institut für physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Gentech) durchgeführt.

3.7.9 Sequenzierung der p53-Fragmente

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977) basiert auf der enzymatischen Kopplung des zu sequenzierenden DNA-Stranges mit einer DNA-Polymerase und auf dem nukleotidspezifischen Abbruch der Synthese. Die DNA muß in einzelsträngiger Form vorliegen. Durch Hybridisierung eine einzelsträngigen Oligonukleotids, in diesem Fall handelte es sich um die bereits angesprochenen p53-Primerpaare mit einer komplementären DNA-Sequenz wird ein doppelsträngiger Bereich geschaffen, von dem aus die Sequenzierung erfolgt.

4 Ergebnisse**4.1 Isolierung von Zellen aus der humanen Mundschleimhaut****4.1.1 Gewinnung humaner Mundschleimhautzellen**

Die Isolierung humaner Epithelzellen aus nativer oraler Mundschleimhaut ist perfektioniert worden, so daß bereits 2 Tage nach der Gewebepreparation ein Auswachsen von Zellen erfolgte (siehe Abb. 9). Ein konfluenter Zellverband zeigte sich in der Regel zwei bis drei Wochen nach der Aufarbeitung des humanen Zellmaterials (siehe Abb. 10). Bereits eine Woche nach der Aufarbeitung der humanen Mundschleimhaut wurde ein Auswachsen von Bindegewebszellen aus dem Gewebeexplantat beobachtet (siehe Abb.11). Ein konfluenter, zusammenhängender Zellverband formierte sich normalerweise zwei bis maximal 3 Wochen nach der Präparation (siehe Abb. 12).

4.1.2 Kultivierung humaner Mundschleimhautzellen

Nach kurzer Zeit ließen sich aus humanen Bindegewebszellen (Fibroblasten/-zyten) Reinkulturen anlegen. Das überschüssige Zellmaterial wurde in Form von Dauerkulturen für spätere Untersuchungen gesichert. Im Gegensatz dazu gestalteten sich die Isolierung und Kultivierung der epithelialen Mundschleimhautzellen (Keratinocyten) wesentlich schwieriger. Das größte Problem bestand in einer „Verunreinigung“ mit Bindegewebszellen. Unterschiedliche Versuchsansätze, die Fibroblasten über eine enzymatische Vorbehandlung (differentielle Trypsinisierung) zu entfernen oder die Kultivierung der Epithelzellen über die Konzentration der Supplemente des Nährmediums zu optimieren, schlugen fehl. Um das unerwünschte Auftreten der Fibroblasten in den Epithelzellkulturen so gering wie möglich zu halten, wurden die epithelialen Zellkulturen täglich kontrolliert (Mikroskop) und im Bedarfsfall durch Entfernung des betreffenden Gewebeexplantats eine Ausbreitung der Bindegewebszellen erfolgreich unterbunden. Die Herstellung einer absolut reinen Keratinocytenkultur aus humaner Mundschleimhaut ist nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung unmöglich.

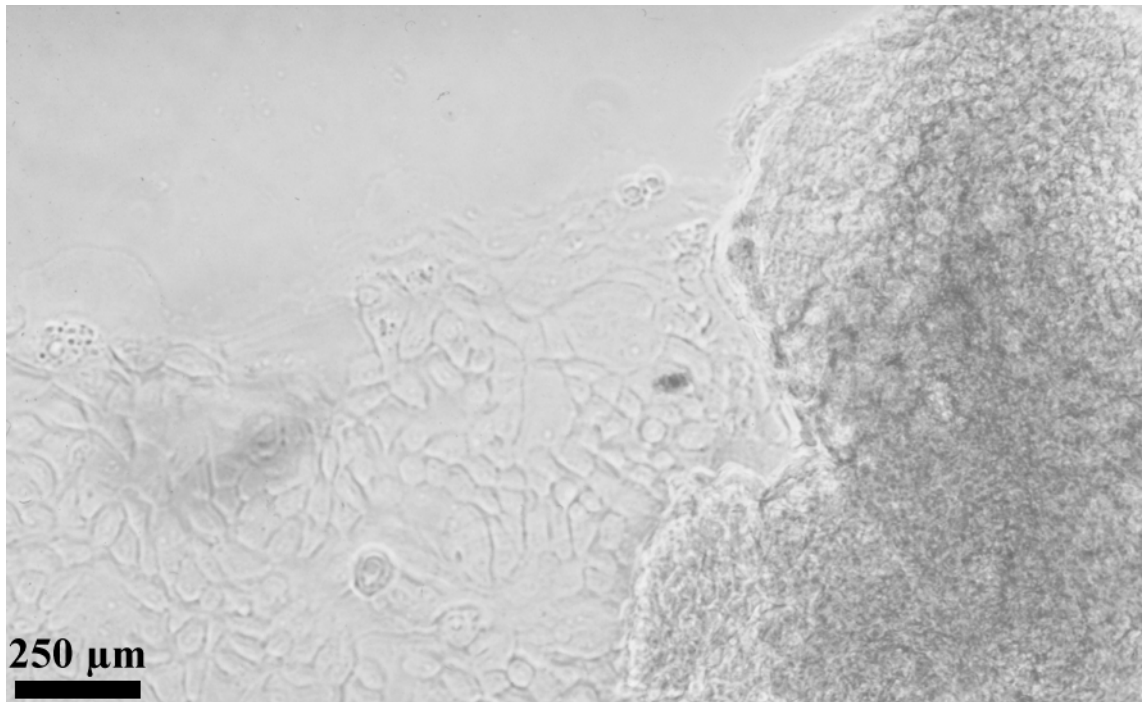


Abb. 9: Auswachsen von Epithelzellen 3 Tage nach Aufarbeitung der humanen Mundschleimhaut in einer phasenkontrastmikroskopischen Aufnahme.

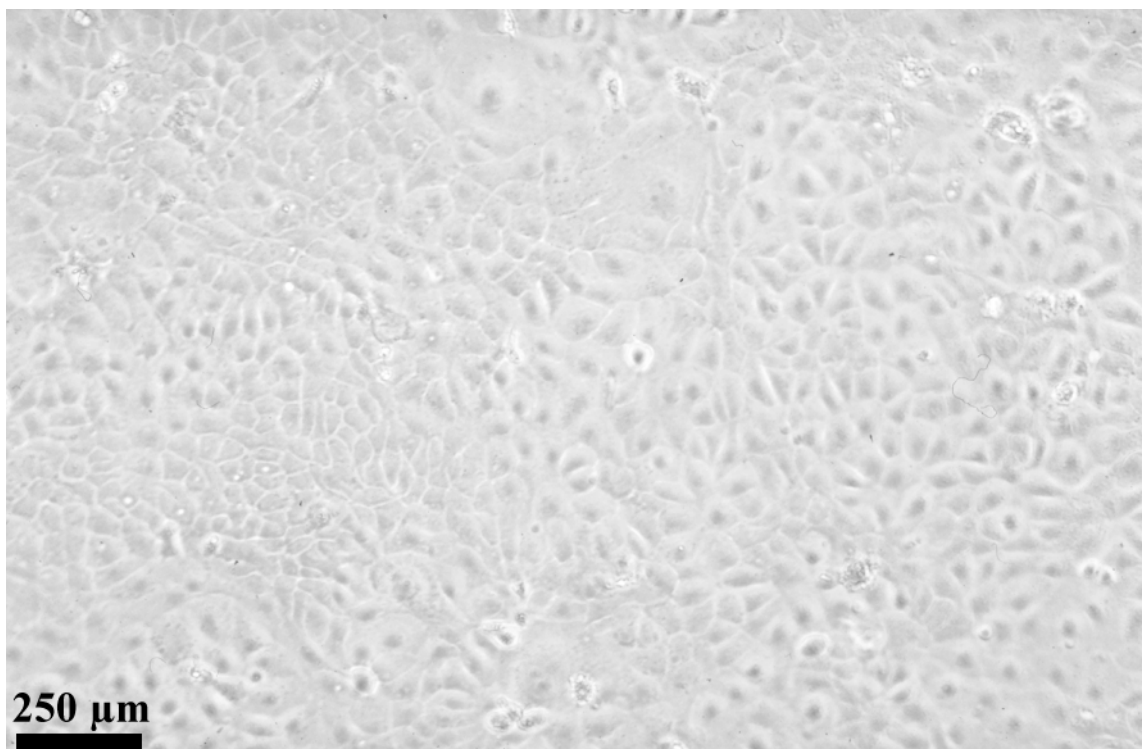


Abb. 10: Epitheliale Mundschleimhautzellen 3 Wochen nach der Gewebepräparation; bereits das ungefärbte Präparat läßt erkennen, daß die Verunreinigung mit Fibroblasten/-zyten sehr gering ist.

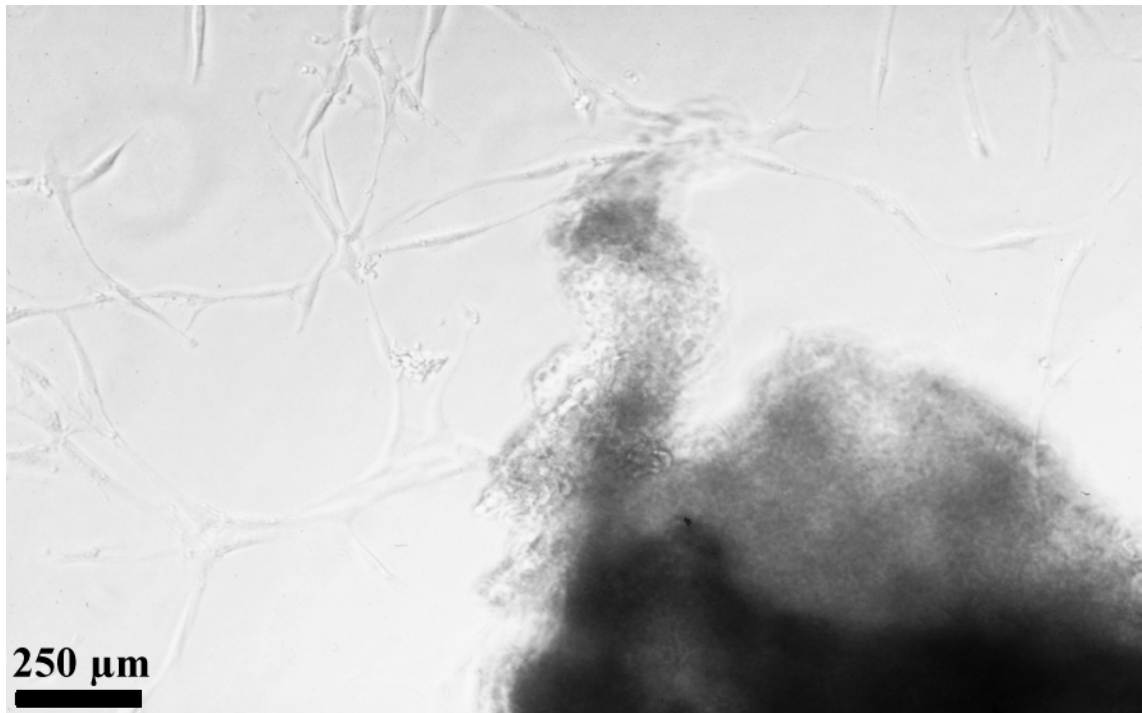


Abb. 11: Humane Fibroblasten/-zyten in Reinkultur 1 Woche nach der Gewebepräparation im Phasenkontrastmikroskop.



Abb. 12: Humane Bindegewebszellen in Reinkultur 3 Wochen nach der Aufarbeitung der humanen Mundschleimhaut in einer phasenkontrastmikroskopischen Aufnahme.

4.2 Organotypische Co-Kulturen der „Kleinen Box“

Es ist aus der wissenschaftlichen Literatur bereits bekannt, daß die relevanten Proliferations- und Differenzierungsprozesse von Zellen in der Regel innerhalb von 14 Tagen abgeschlossen sind. Unter Berücksichtigung dieser Resultate wurden dem dreidimensionalen System „Kleine Box“ nach den Tagen 4, 7, 10, 12, 14 bzw. 16 die Kulturen entnommen und histologisch sowie immunocytochemisch aufgearbeitet.

Um das gezüchtete Gewebematerial hinsichtlich seiner physiologischen Integrität beurteilen zu können, wurde native Mundschleimhaut humanen Ursprungs bei allen Untersuchungen als Vergleichskontrolle eingesetzt.

4.2.1 Histologische Charakterisierung

4.2.1.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Bei der ersten organotypischen Co-Kultur konnte neben einem homogen ausgerichteten Fibroblasten-Collagengel noch kein epitheliales Wachstum beobachtet werden. Bereits nach 1wöchiger Kultivierung in dem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem lagen dem locker strukturierten Fibroblastengel in der Regel 1-4 kompakte Zellschichten auf. Im Verlauf der weiteren Untersuchungen konnte ein stetes Wachstum dieser Region beobachtet werden, wobei nach etwa 14tägiger Inkubationszeit eine der nativen Mundschleimhaut (siehe Abb. 14) vergleichbare Ausprägung bezüglich der Dicke (ca. 500 µm) erzielt wurde (siehe Abb. 13). Bei den zuletzt entnommenen organotypischen Co-Kulturen (Tag 16) waren bereits erste Degradierungsanzeichen zu erkennen, die sich in einem Zusammenziehen des die Bindegewebszellen enthaltenden Collagengels sowie einer beginnenden Auflockerung des kompakt strukturierten Epithels zeigten.

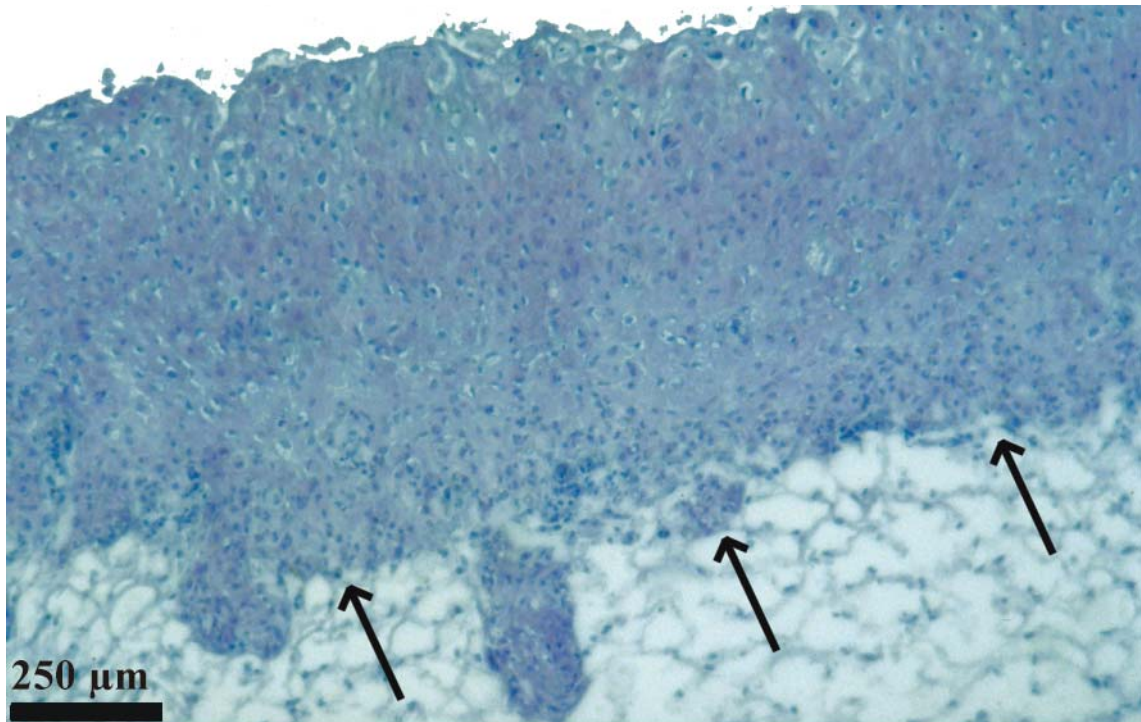


Abb. 13: HE-Darstellung einer organotypischen Co-Kultur nach 14tägiger Kultivierung in dem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem „Kleine Box“; die Pfeile deuten den Verlauf der Basalmembran (BM) an, die bei direkter mikroskopischer Beobachtung erkennbar war.

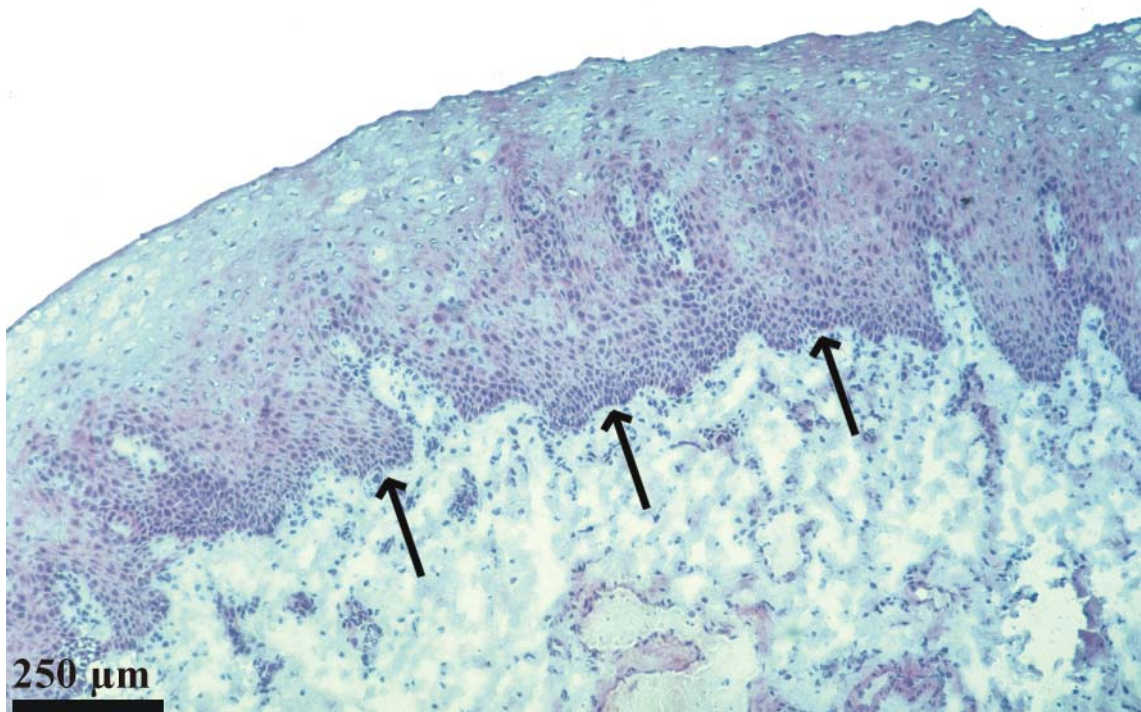


Abb. 14: HE-Färbung einer physiologisch-intakten Mundschleimhaut als interne Vergleichskontrolle; Pfeile wie in Abbildung 13.

4.2.1.2 PAS-Färbung

Die PAS-Darstellung wurde für die lichtmikroskopische Detektion der Basalmembran (BM) herangezogen, wobei die Ausbildung dieser besonderen Struktur zu einer charakteristischen Farbreaktion (purpur) führte.

Bei der ersten Kultur, die nach 4 Tagen aus dem dreidimensionalen System genommen wurde, brachte die PAS-Reaktion ein negatives Ergebnis. Auch bei den nächsten organotypischen Co-Kulturen (Kultivierungstage 7 und 10) konnte die Ausbildung einer Basalmembran mit dieser Färbung nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren nicht verwunderlich, da sich in den ersten Kultivierungstagen, wie schon bei der vorherigen Untersuchung dargestellt, das weitmaschige Fibroblastengel ausrichtet und die Epithelzellen über interaktive Kräfte an die Fütterschicht anhaften. Erst jetzt kann sich die Basalzellschicht aus epithelialen Mundschleimhautzellen bilden und die BM aufbauen. Diese besondere Zelllage war bereits bei der nächsten Probe (Kultivierungstag 12) im Lichtmikroskop sichtbar. Dementsprechend konnte bei dieser organotypischen Co-Kultur die Ausbildung einer BM, wenn auch nur schwach, mit der PAS-Reaktion nachgewiesen werden. Am intensivsten reagierten die Gewebeprobe, die nach zweiwöchiger Inkubationszeit untersucht wurde. Es zeigte sich unterhalb des kompaktstrukturierten Epithels ein schmales intensiv purpur-angefärbtes Band, die Basalmembran (siehe Abb. 15). Auch im histologischen Präparat der letzten organotypischen Co-Kultur, die am 16. Kultivierungstag entnommen wurde, fiel die Nachweisreaktion positiv aus. Um eine direkte Vergleichsmöglichkeit zu haben, wurde, wie schon bei der Färbung zuvor, humanes Nativgewebe als interne Kontrolle eingesetzt (siehe Abb. 16).

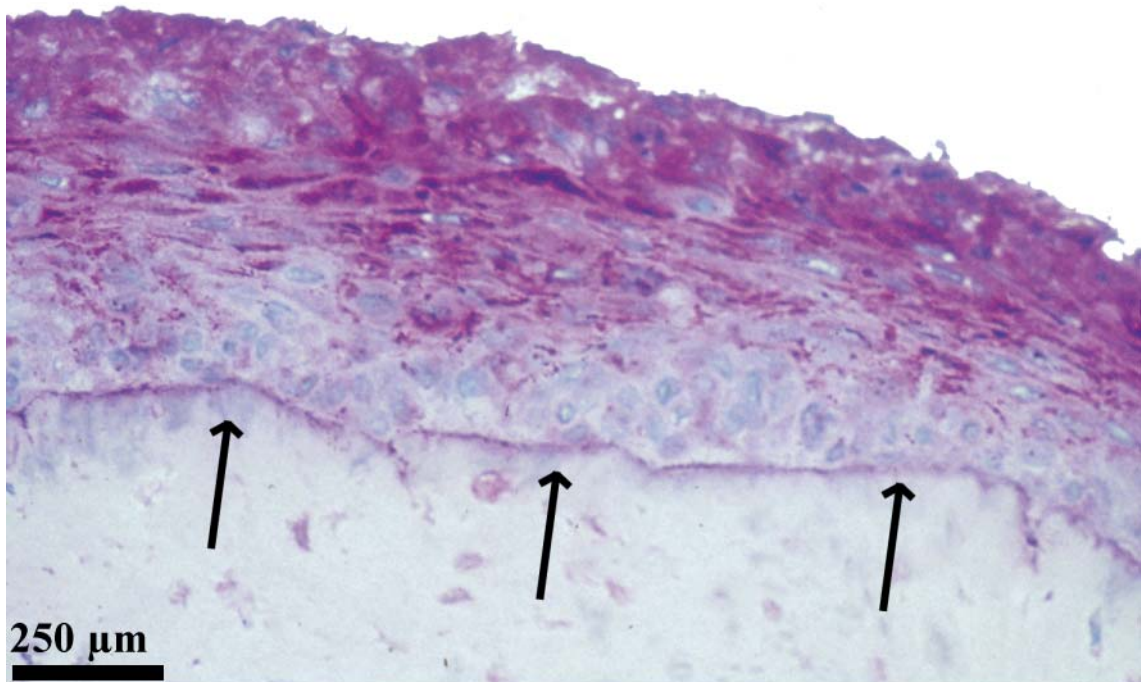


Abb. 15: PAS-Darstellung einer organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen nach 14tägiger Anzucht in der „Kleinen Box“; Pfeile markieren die wiederum die BM.

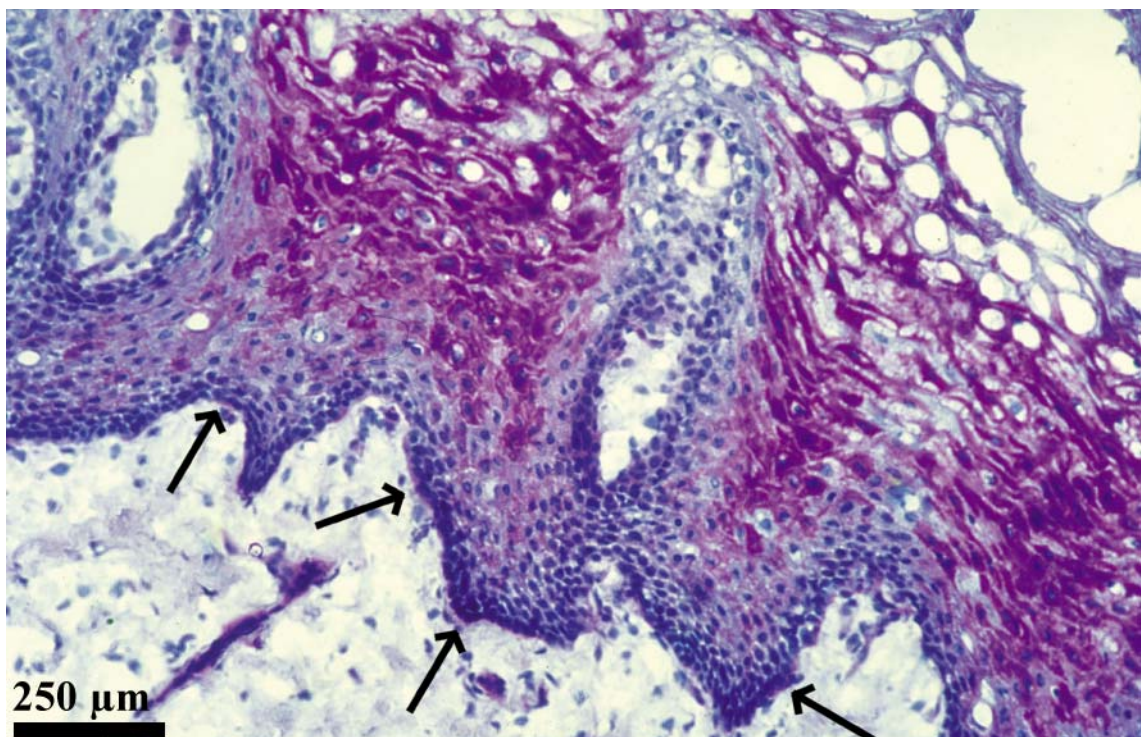


Abb. 16: PAS-Färbung der nativen Mundschleimhaut des Menschen; Pfeile lokalisieren die BM.

4.2.2 Immuncytochemische Charakterisierung

4.2.2.1 Kontrastfärbung DAPI

Die DAPI-Kernfärbung wurde bei jedem zu untersuchenden Gewebeschnitt eingesetzt und hatte methodische Kontrollfunktion. Sie diente ausschließlich der Überprüfung der zuvor durchgeführten indirekten Immunfluoreszenz. Stellvertretend wurde Abbildung 17 ausgewählt, das eine gesunde, humane Mundschleimhaut nach DAPI-Behandlung zeigt.

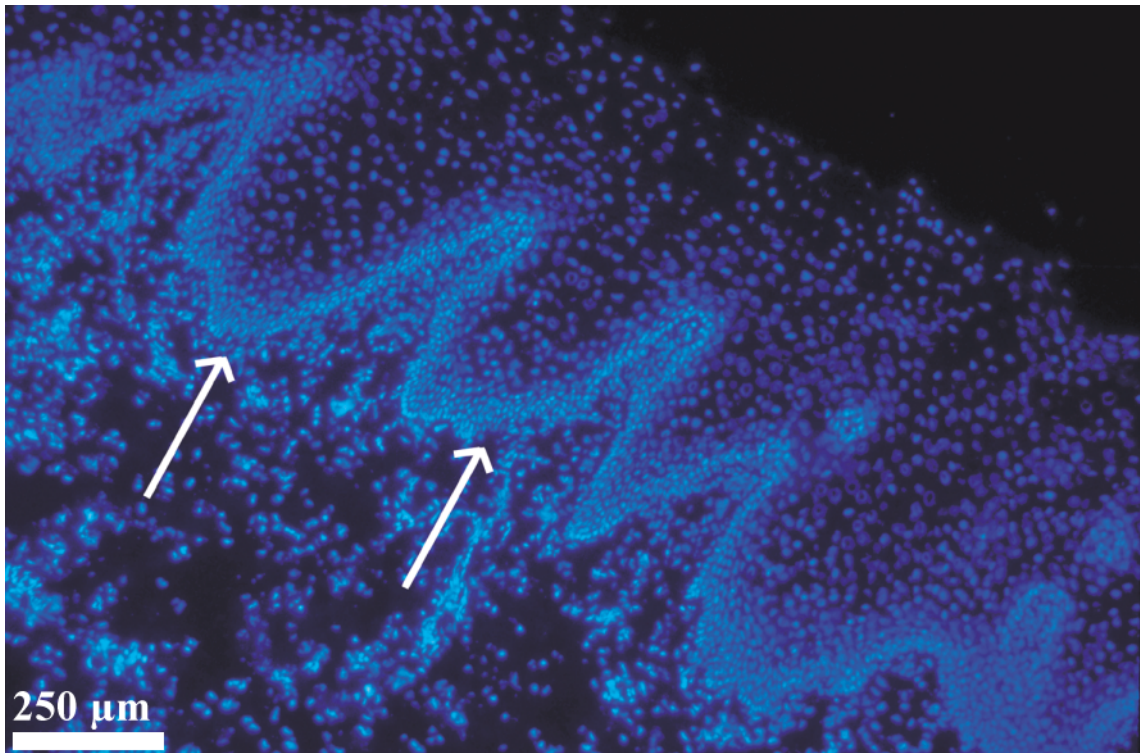


Abb. 17: Native Mundschleimhaut nach DAPI-Färbung; Pfeile markieren die intensiv fluoreszierenden Zellkerne der basalen Zellschicht, welche die Basalmembran aufbaut.

Wie in dieser Aufnahme bereits zu sehen ist, trennt die BM das kompakte Epithel (rechts in der Abbildung) von dem locker strukturierten Bindegewebe (links in der Aufnahme lokalisiert).

4.2.2.2 Nachweis von Cytokeratin 14 (CK 14)

Das Intermediärfilament Cytokeratin 14 wird ausschließlich von Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert und diente in dieser Arbeit daher als Universalmarker, um den entwicklungsbiologischen Ursprung des gezüchteten Gewebes eindeutig zu definieren.

Tabelle 11: Nachweis von CK 14 der organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	∅
7	+
10	++
12	+++
14	+++
16	++

Nach einer Kultivierungsdauer von 4 Tagen konnte noch keine Expression des epithelialen Universalmarkers im Gewebeschnitt detektiert werden. Im Gegensatz hierzu ließ sich ab dem 7. Kultivierungstag (Entnahme der zweiten organotypischen Co-Kultur) das Cytokeratin 14 in schwacher Konzentration (schwache Fluoreszenz) im gezüchteten Gewebe nachweisen (siehe Tabelle 11). Die Intensität der Färbung, die das komplette Epithel erfaßte, nahm mit fortschreitender Kultivierungszeit zu und erreichte an den Versuchstagen 12 und 14 ein Maximum (siehe Abb. 18). Bei dem *in vitro* gezüchteten Humangewebe, das nach 16tägiger Inkubation dem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem entnommen wurde, war bereits wieder eine Abnahme der Färbeintensität für den epithelialen Marker CK 14 im Vergleich zu dem parallel behandelten nativen Humangewebe (siehe Abb. 19) zu beobachten.

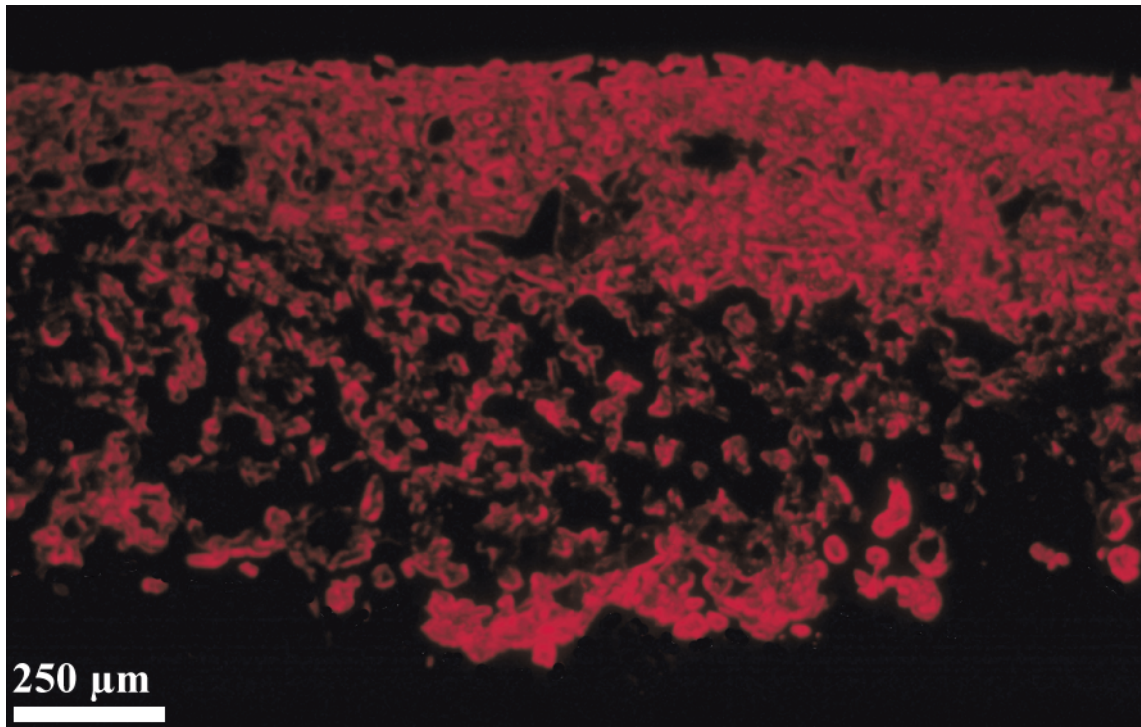


Abb. 18: Immuncytochemischer Nachweis von CK 14 am Gewebeschnitt einer in vitro gezüchteten humanen Mundschleimhaut nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen.

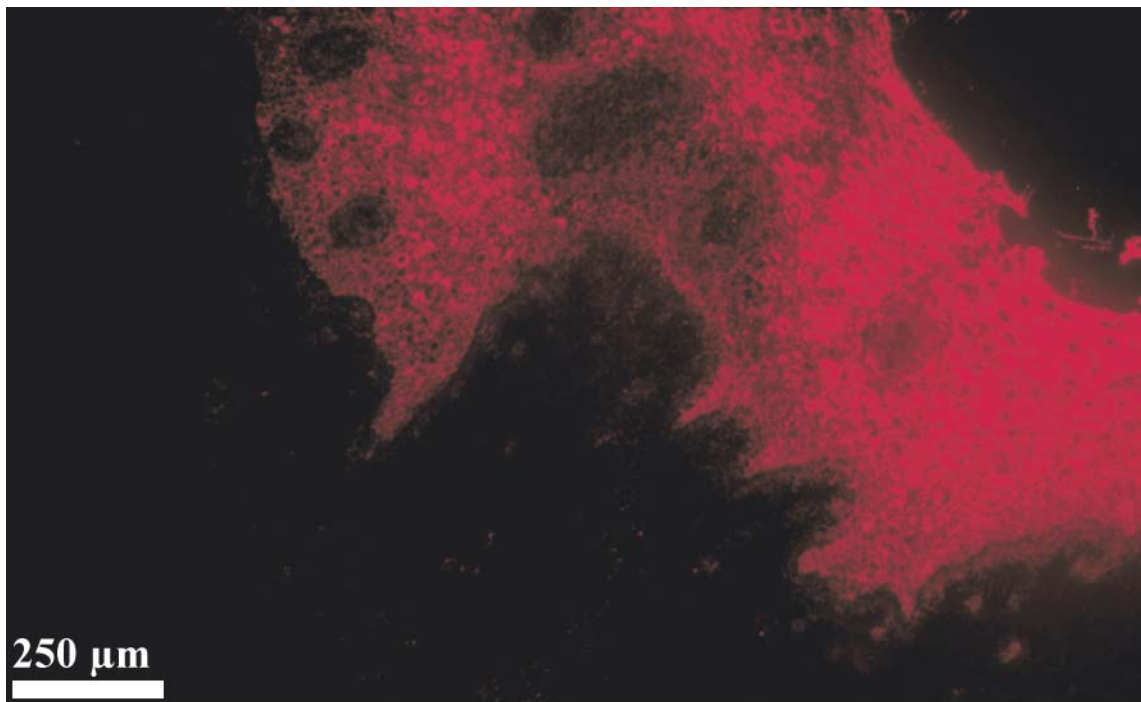


Abb. 19: CK 14-Nachweis am Gewebeschnitt des humanen Nativmaterials als interne Vergleichskontrolle.

4.2.2.3 Nachweis von Cytokeratin 4 (CK 4)

Cytokeratin 4 gehört ebenfalls zur Gruppe der Intermediärfilamente und wurde als differenzierungsspezifischer Marker zur Beurteilung der *in vitro* gezüchteten, humanen Mundschleimhaut eingesetzt. Seine Expression erfolgt unter physiologischen Bedingungen in den frühen Stadien der Zelldifferenzierung in den suprabasalen Zellschichten, wobei ausschließlich die epithelialen Zellen als „Produzenten“ fungieren. Die Ergebnisse der immunocytochemischen Untersuchungen wurden in Tabelle 12 festgehalten.

Tabelle 12: Nachweis von CK 4 der organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	Ø
7	+
10	++
12	+++
14	+++
16	++

Das differenzierungsspezifische Cytokeratin 4 war erstmals nach 7 Tagen in der Kultur immunocytochemisch nachweisbar. Die Intensität des Färbeergebnisses, die als Indiz für die Synthese von CK 4 gewertet wurde, nahm im Laufe der Kultivierung zu und erreichte nach einer Kulturdauer von 14 Tagen ein Maximum (siehe Abb. 20). Eine Abnahme der Färbeintensität in den organotypischen Co-Kulturen zeichnete sich bereits am 16. Kultivierungstag (Entnahme des letzten Membraneinsatzes) ab. Im Gegensatz zur *in vivo* Situation (siehe Abb. 21) erfaßte die Expression von Cytokeratin 4 mitunter auch das komplette Epithel.

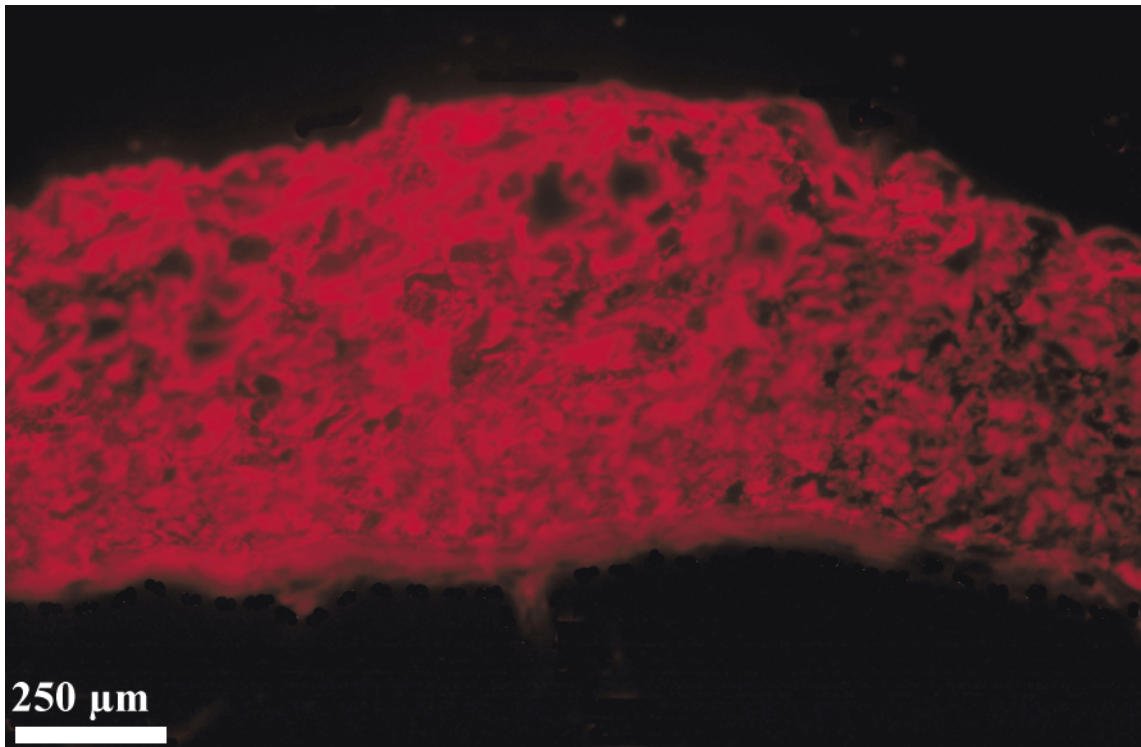


Abb. 20: Immunocytochemische Darstellung von CK 4 einer organotypischen Co-Kultur nach 14tägiger Kultivierung in dem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem „Kleine Box“.

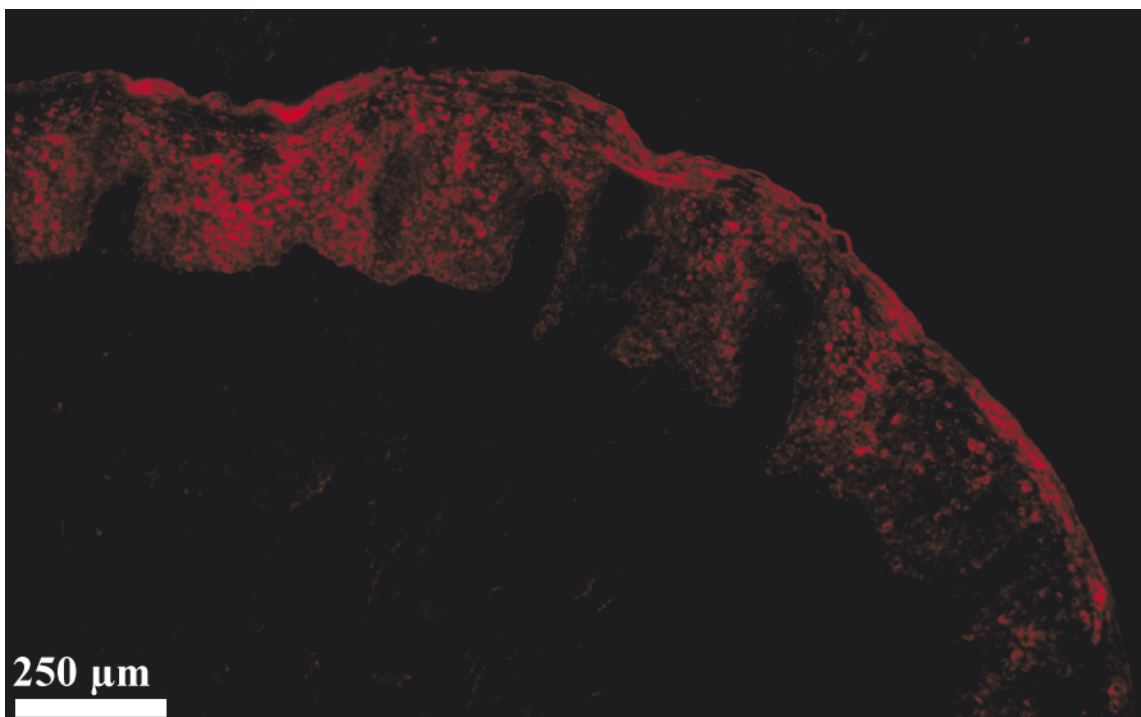


Abb. 21: Immunocytochemischer Nachweis von CK 4 am Gefrierschnitt einer physiologisch-intakten Mundschleimhaut des Menschen.

4.2.2.4 Nachweis von Cytokeratin 13 (CK 13)

Die Expression von Cytokeratin 13 ist eng vergesellschaftet mit dem Synthese von Cytokeratin 4 und erfolgt ebenfalls während der frühen Phase der Zelldifferenzierung in den suprabasalen Zellschichten des Epithels der physiologisch intakten Mundschleimhaut des Menschen.

Tabelle 13: Nachweis von CK13 der organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	Ø
7	+
10	++
12	+++
14	+++
16	++

Das Auftreten des differenzierungsspezifischen Cytokeratins 13 wurde, wie schon bei der vorherigen Untersuchung, erstmals nach 7tägiger Kultivierung der organotypischen Co-Kultur beobachtet. Auch hier stieg die Intensität der CK 13-Färbung mit zunehmender Versuchsdauer kontinuierlich an und erreichte ebenfalls nach einer Inkubationszeit von etwa 2 Wochen das Maximum (siehe Abb. 22). Eine Abnahme der Färbeintensität in den organotypischen Co-Kulturen zeichnete sich, nach vergleichender Betrachtung mit dem analog behandelten Kontrollgewebe (siehe Abb. 23), nach einer Kultivierungszeit von 16 Tagen ab.

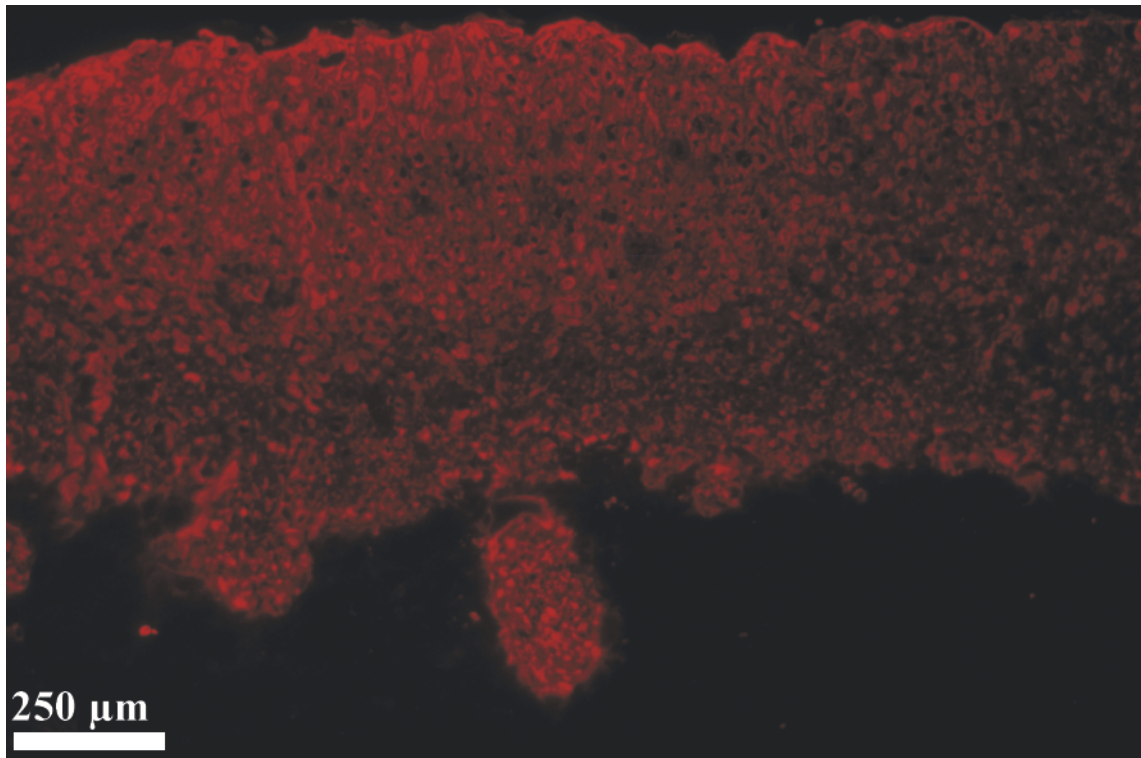


Abb. 22: CK 13-Nachweis mittels IIF am 10 μm dicken Gefrierschnitt einer 14 Tage alten organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen.

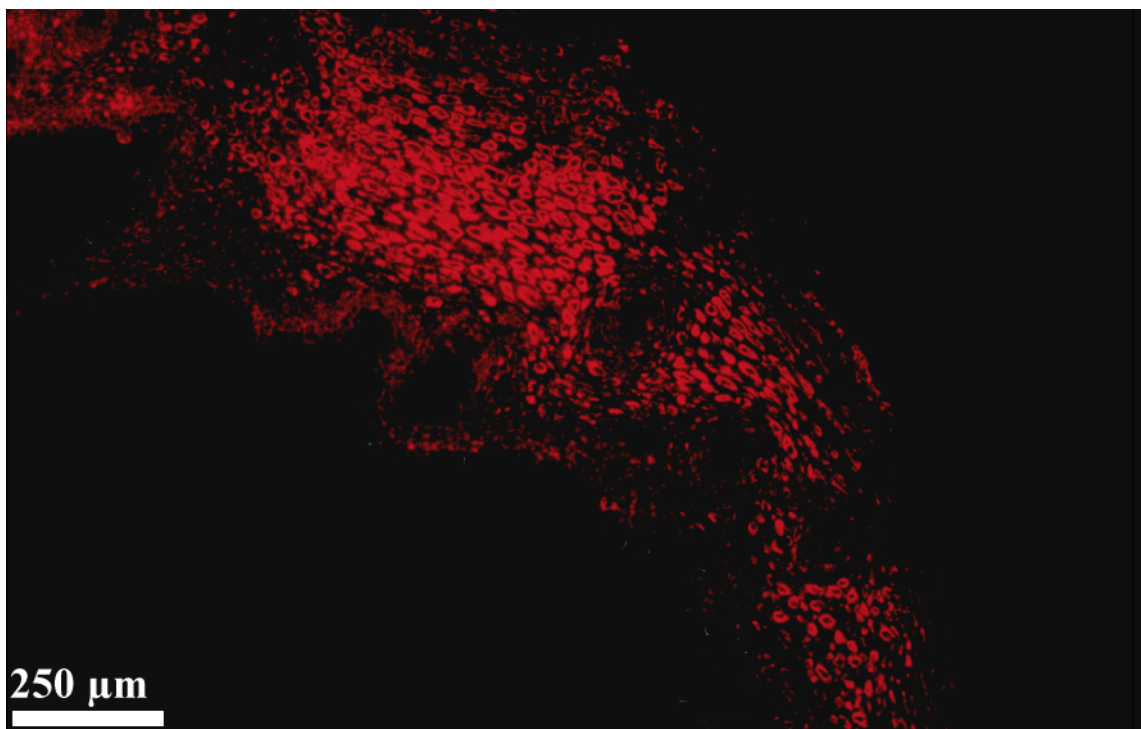


Abb. 23: CK 13-Nachweis einer humanen Mundschleimhaut im Gewebeschnitt mit der IIF-Methode.

4.2.2.5 Nachweis von Desmoglein 2 (DG 2)

Als weitere Komponente des Cytoskeletts wurde der desmosomale Marker Desmoglein 2 immunocytochemisch nachgewiesen. Bei den Desmosomen handelt es sich um interzelluläre Bindungselemente, die in Epithelien die Zell-Zell-Adhäsion maßgeblich beeinflussen. Die Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgte in Tabelle 14.

Tabelle 14: Nachweis von DG 2 der organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	∅
7	+
10	++
12	+++
14	+++
16	++

Die untersuchten organotypischen Co-Kulturen aus Epithel- und Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut zeigten nach 1wöchiger Inkubationszeit eine schwache und ab dem 10. Kultivierungstag in der dreidimensionalen Box eine gut detektierbare Expression dieses Markers. Die immunocytochemische Behandlung der Kryoschnitte organotypischer Co-Kulturen der folgenden Kultivierungstagen ergab, daß die Intensität der Desmoglein 2-Färbung am 14. Tag der Anzucht am höchsten war (siehe Abb. 24). Bei der zuletzt entnommen organotypischen Co-Kultur (Kultivierungstag 16) zeigte die Nachweisreaktion für den biochemischen Marker Desmoglein 2 bereits wieder eine abnehmende Tendenz, wie schon bei den Testparametern zuvor. Als interne Kontrolle diente wiederum ein Gewebeschnitt von 10 µm Dicke einer physiologischen Mundschleimhaut des Menschen (siehe Abb. 25).

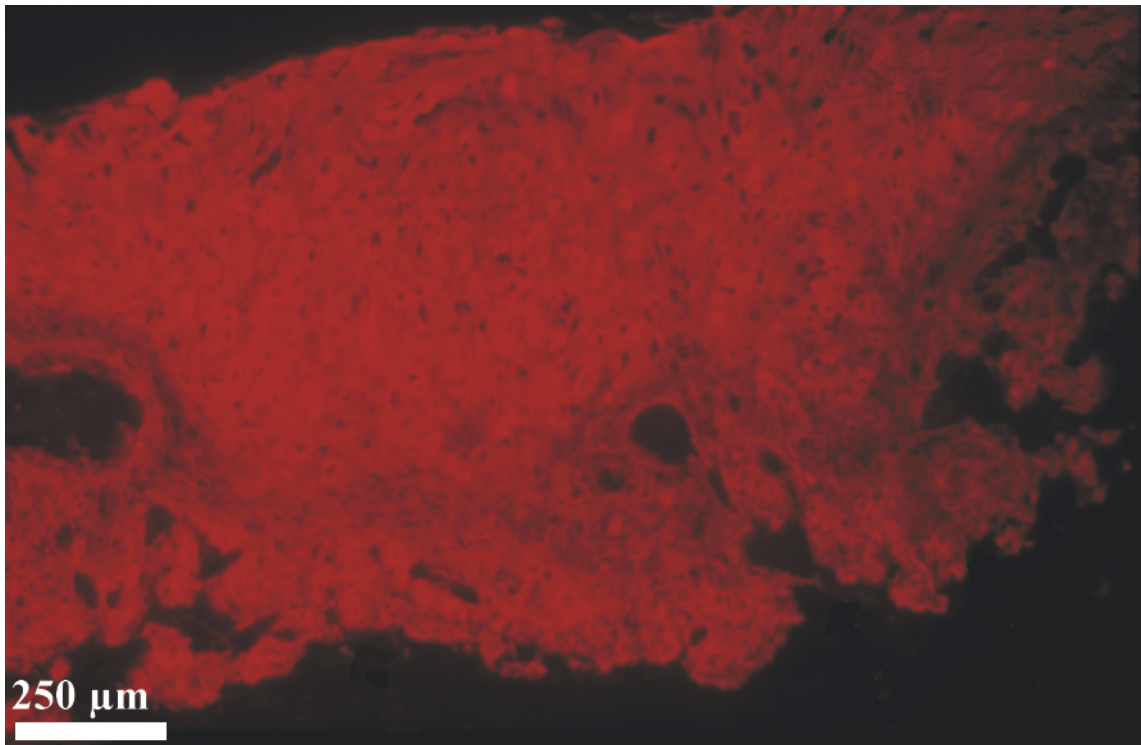


Abb. 24: Fluoreszenz-Nachweis von DG 2 einer 14 Tage kultivierten organotypischen Co-Kultur.

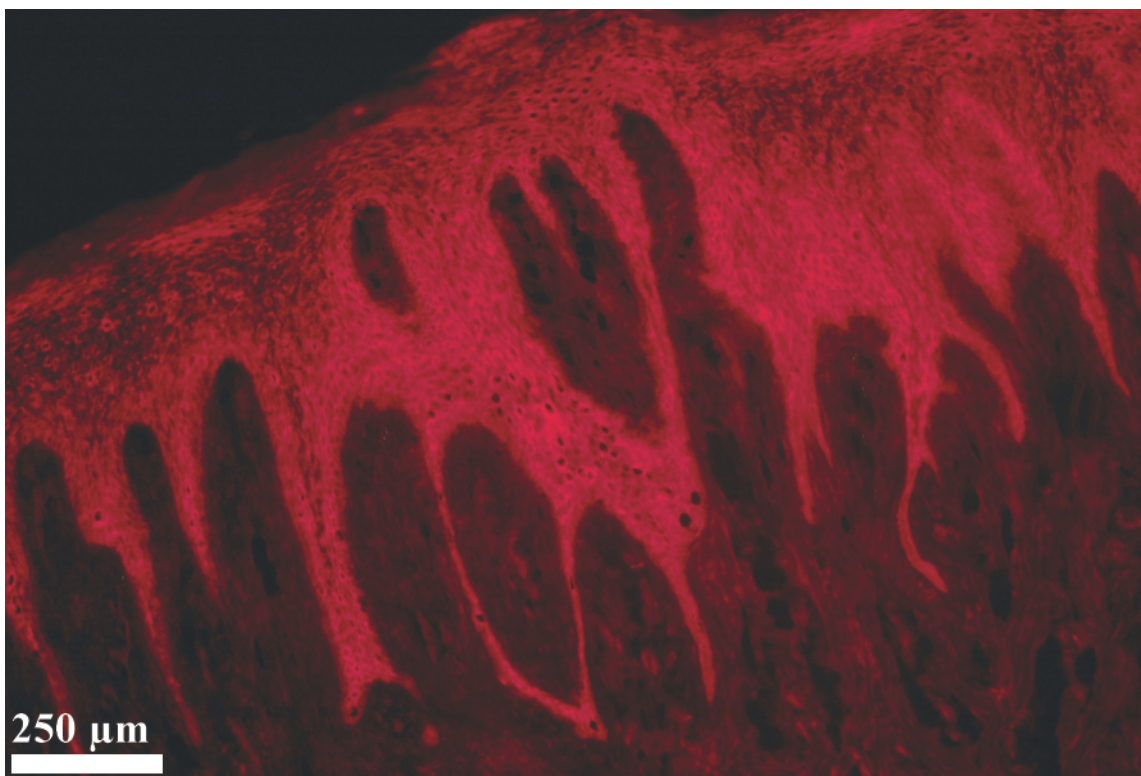


Abb. 25: Nachweis von DG 2 mittels IIF an humanem Oralgewebe.

4.2.2.6 Nachweis von Desmoplakin 1 und 2 (DP 1&2)

Die Desmosomen produzieren ebenfalls die adhäsiven Bindungselemente Desmoplakin 1 und 2, die in enger Beziehung zu dem bereits dargestellten Desmoglein 2 stehen. Die Expression wurde ebenfalls mit der Immuncytochemie (IIF) nachgewiesen.

Tabelle 15: Nachweis von DP 1&2 der organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	∅
7	+
10	++
12	+++
14	+++
16	++

Die erhaltenen Resultate spiegelten exakt die Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen zu Desmoglein 2 wider. So ließen sich die Desmoplakine 1 und 2 erst nach 7tägiger Kultivierung anhand einer schwachen Fluoreszenz im Gefrierschnitt immuncytochemisch detektieren (siehe Tabelle 15). Die Intensität der Färbung stieg mit zunehmender Kultivierungsdauer kontinuierlich an und erreichte nach ca. 2wöchiger Inkubationszeit in dem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem ihr Maximum (siehe Abb. 26). Weiterhin fiel die Nachweisreaktion für DP 1&2 bei der organotypischen Co-Kultur am Kultivierungstag 16 deutlich schwächer aus. Zur vergleichenden Betrachtung wurde ebenfalls ein parallel aufgearbeiteter Gewebeschnitt einer physiologisch-intakten, humanen Mundschleimhaut herangezogen (siehe Abb. 27).

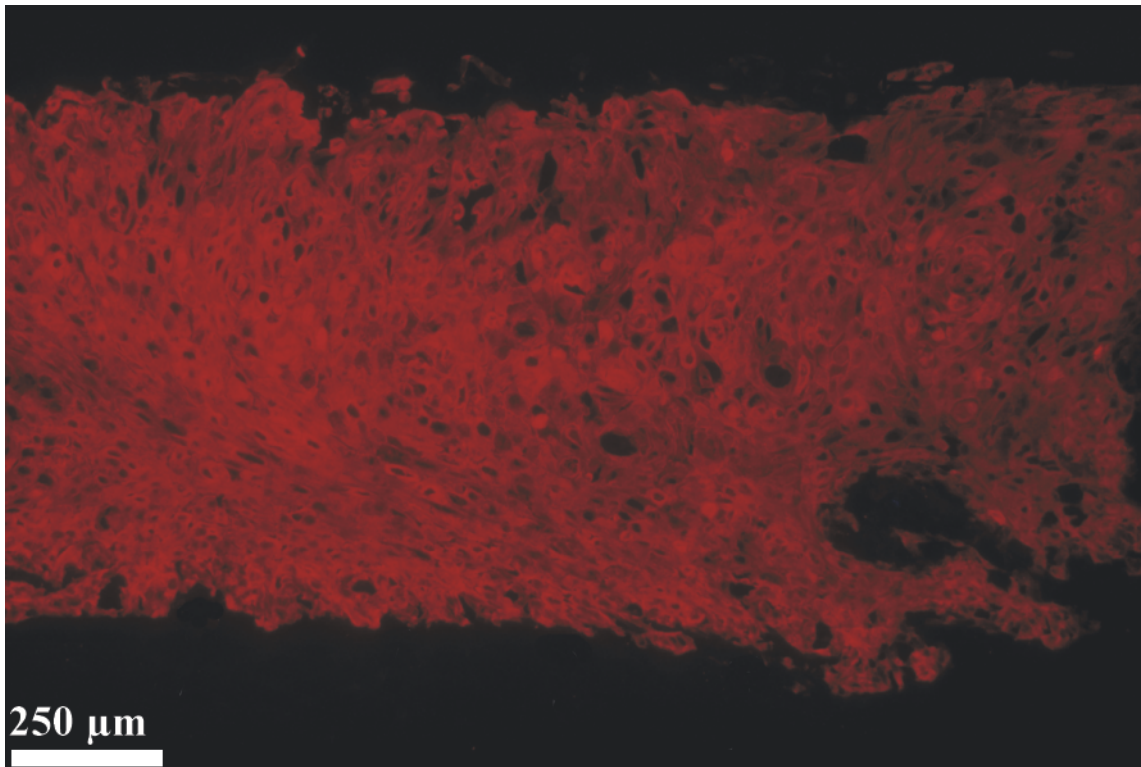


Abb. 26: Nachweis von Desmoplakin 1 und 2 am 10 μm Gewebeschnitt der organotypischen Co-Kultur nach 2wöchiger Anzüchtung in der „Kleinen Box“.

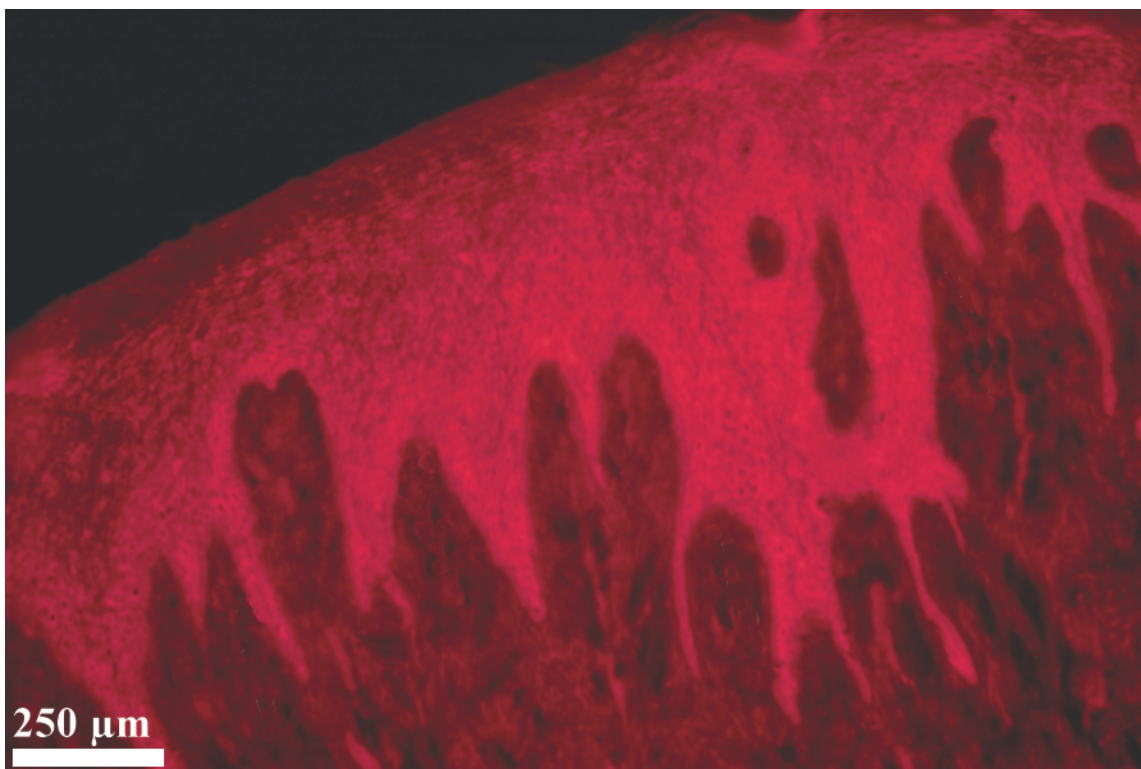


Abb. 27: Nachweis von DP1&2 am Kontrollschnitt der gesunden, humanen Mundschleimhaut.

4.2.2.7 Nachweis von Collagen Typ IV (Coll IV)

Das Collagen Typ IV ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es ist an vielen elementaren Zellprozessen beteiligt und bildet zusammen mit Laminin die Hauptbestandteile der Basalmembran. Der Nachweis erfolgte wiederum immunocytochemisch, wobei die Resultate der Verlaufskontrolle in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 16) aufgelistet wurden.

Tabelle 16: Nachweis von Coll IV der organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	∅
7	∅
10	+
12	++
14	+++
16	++

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ließ sich Collagen Typ IV weder am 4. noch am 7. Kultivierungstag in den organotypischen Co-Kulturen nachweisen. Erst nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen in der „Kleinen Box“ zeigte sich im Gefrierschnitt des *in vitro* gezüchteten humanen Untersuchungsmaterials ein schwach-positives Fluoreszenzsignal (siehe auch Tabelle 16). Die Intensität der Färbung (Fluoreszenz) nahm im Laufe der Kultivierungszeit zu und erreichte nach 2 Wochen ihre stärkste Ausprägung (siehe Abb. 28). Ab dem 16. Versuchstag zeigte die Nachweisreaktion für diesen biochemischen Marker wieder abnehmende Tendenz. Dieses Resultat stimmte qualitativ mit den vorherigen Untersuchungen überein, hinsichtlich der Kinetik der Expression verhielt sich Collagen jedoch anders als die bisher untersuchten Marker. Dabei diente „Bezugsgröße“ wiederum das auf gleiche Art und Weise aufgearbeitete humane Nativmaterial (siehe Abb. 29).

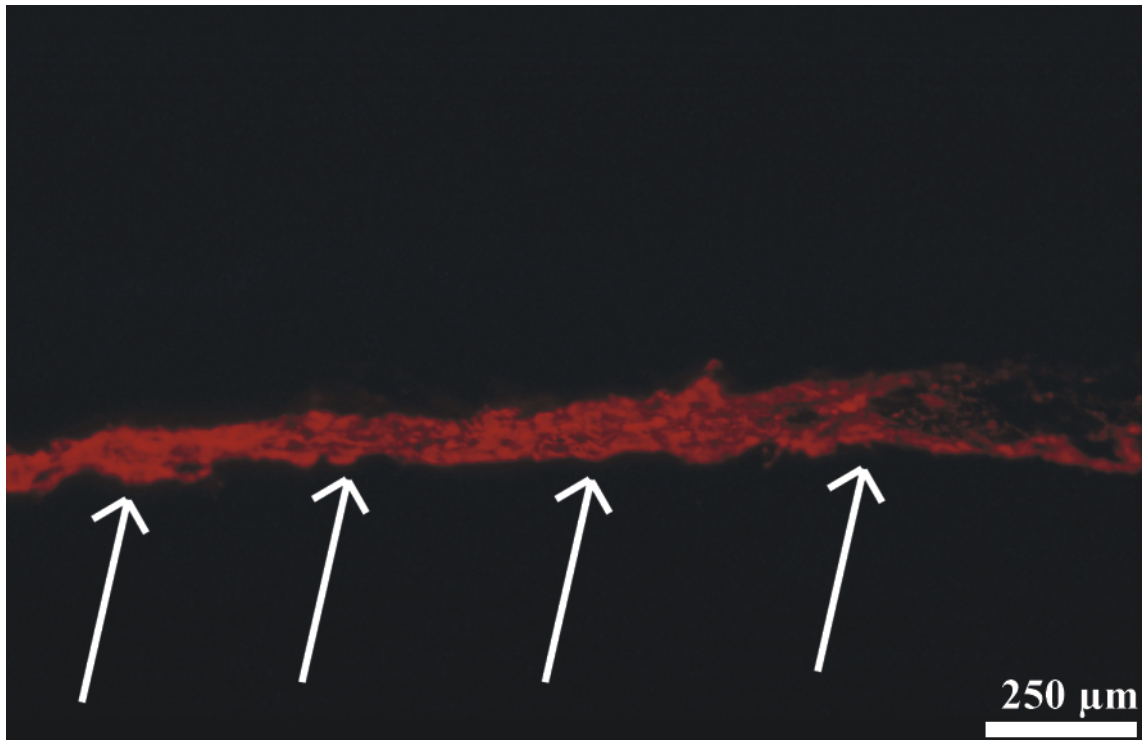


Abb. 28: Nachweis von Collagen Typ IV nach 2wöchiger Kultivierung der organotypischen Co-Kultur, wobei die Pfeile zur BM (schmale Region unterhalb des Gürtels) gerichtet sind.



Abb. 29: Coll IV-Nachweis (IIF) an der humanen Mundschleimhaut; Pfeile markieren die BM.

4.2.2.8 Nachweis von Laminin

Als weiterer Bestandteil der extrazellulären Matrix wurde Laminin mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Neben einer Beteiligung am Aufbau der Basalmembran vermittelt es die Anheftung der Epithelzellen an die Basalzellschicht.

Tabelle 17: Nachweis von Laminin der organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	∅
7	∅
10	+
12	++
14	+++
16	++

Laminin ließ sich erst nach 10 Kulturtagen mit der indirekten Immunfluoreszenz nachweisen (siehe Tabelle 17). Das beste Färbeergebnis wurde auch hier nach einer 2wöchigen Anzucht des humanen Materials in dem modifizierten Zellkultivierungssystem erzielt (siehe Abb. 30). Wie die immuncytochemischen Untersuchungen ergaben, zeigte die Intensität der Färbung bereits ab dem 16. Kultivierungstag wieder abnehmende Tendenz. Als interne Vergleichskontrolle diente wiederum ein Kontrollschnitt der physiologisch-intakten Mundschleimhaut des Menschen, bei dem ebenfalls Laminin mit der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde (siehe Abb. 31).

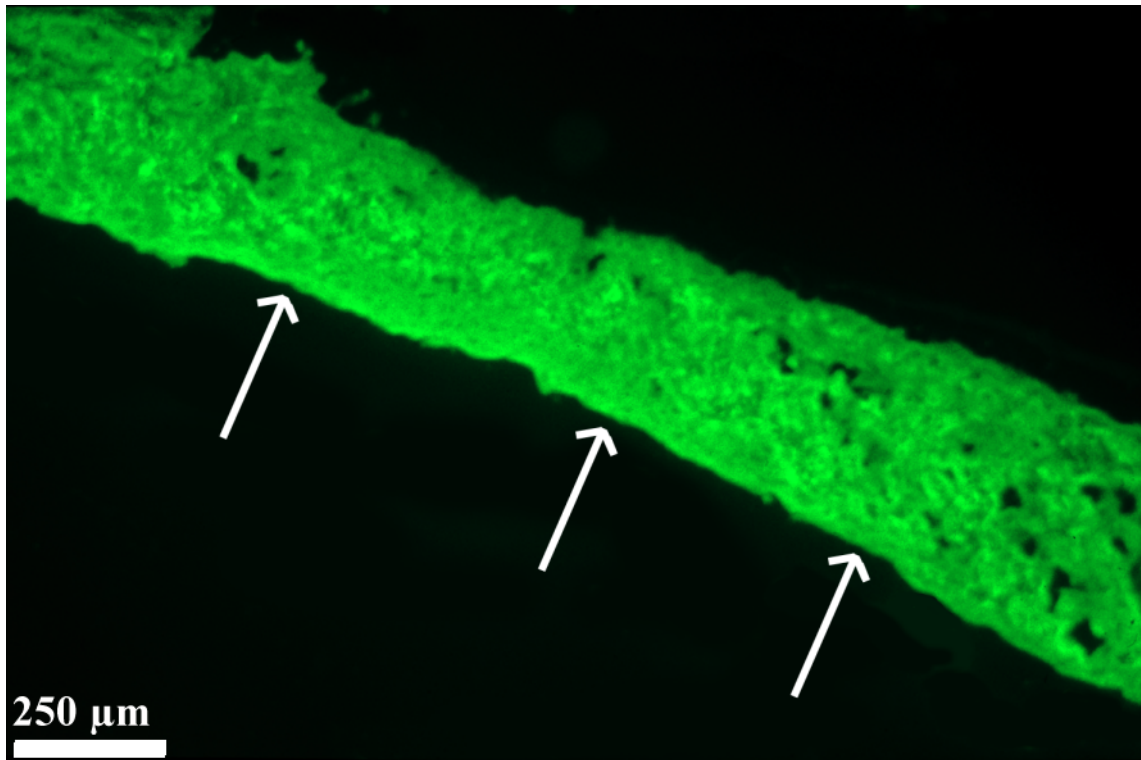


Abb. 30: Nachweis von Laminin an der organotypischen Co-Kultur nach 2wöchiger Kultivierung; Pfeile markieren die ausgebildete BM, die nur bei direkter mikroskopischer Beobachtung deutlich zu erkennen war.

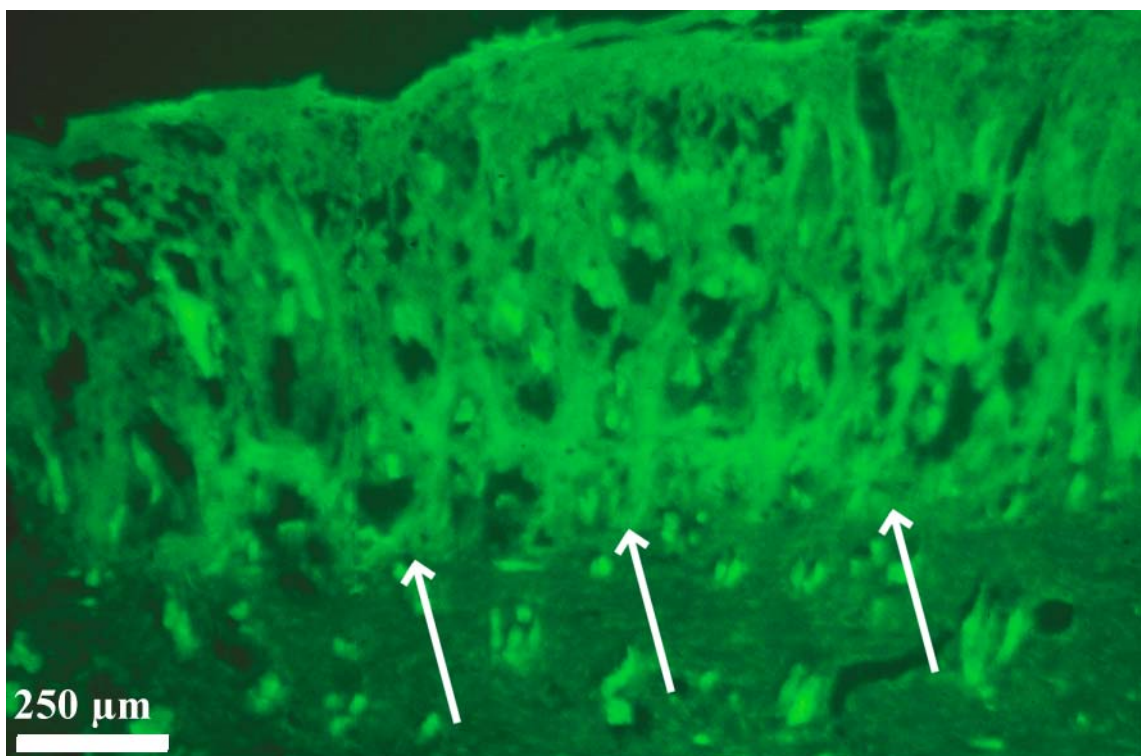


Abb. 31: Nachweis von Laminin mittels IIF an humanem Kontrollgewebe; Pfeile weisen auf die BM hin.

4.2.2.9 Nachweis von Fibronectin

Bei Fibronectin handelt es sich um ein Glycoprotein der extrazellulären Matrix (ECM), das mit einer Vielzahl von anderen ECM-Molekülen in Wechselwirkung tritt und maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Gewebestruktur beiträgt. Es wird unter physiologischen Bedingungen von den Zellen des Mesenchyms exprimiert.

Tabelle 18: Nachweis von Fibronectin bei der in vitro gezüchteten humanen Mundschleimhaut

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	+
7	++
10	++
12	+++
14	+++
16	++

Bereits am 4. Kultivierungstag ließ Fibronectin sich in den immuncytochemisch behandelten Gefrierschnitten im Collagengel der organotypischen Co-Kulturen eindeutig nachweisen (siehe Tabelle 18). Dies unterscheidet den Befund von allen bisher beschriebenen Ergebnissen. Die Intensität der Nachweisreaktion, die auf das Fibroblastengel begrenzt war, zeigte mit fortschreitender Kultivierungszeit eine ansteigende Tendenz und erreichte zwischen den Versuchstagen 10 und 14 die stärkste Ausprägung (siehe Abb. 32). Wie die Untersuchungen der organotypischen Co-Kulturen am 16. Kultivierungstag in dem dreidimensionalen System „Kleine Box“ ergaben, fiel die Nachweisreaktion für diesen biochemischen Marker in Relation zur Kontrolle (Abb. 33: physiologische Mundschleimhaut des Menschen) und analog zu den bereits dargestellten Befunden merklich schwächer aus.

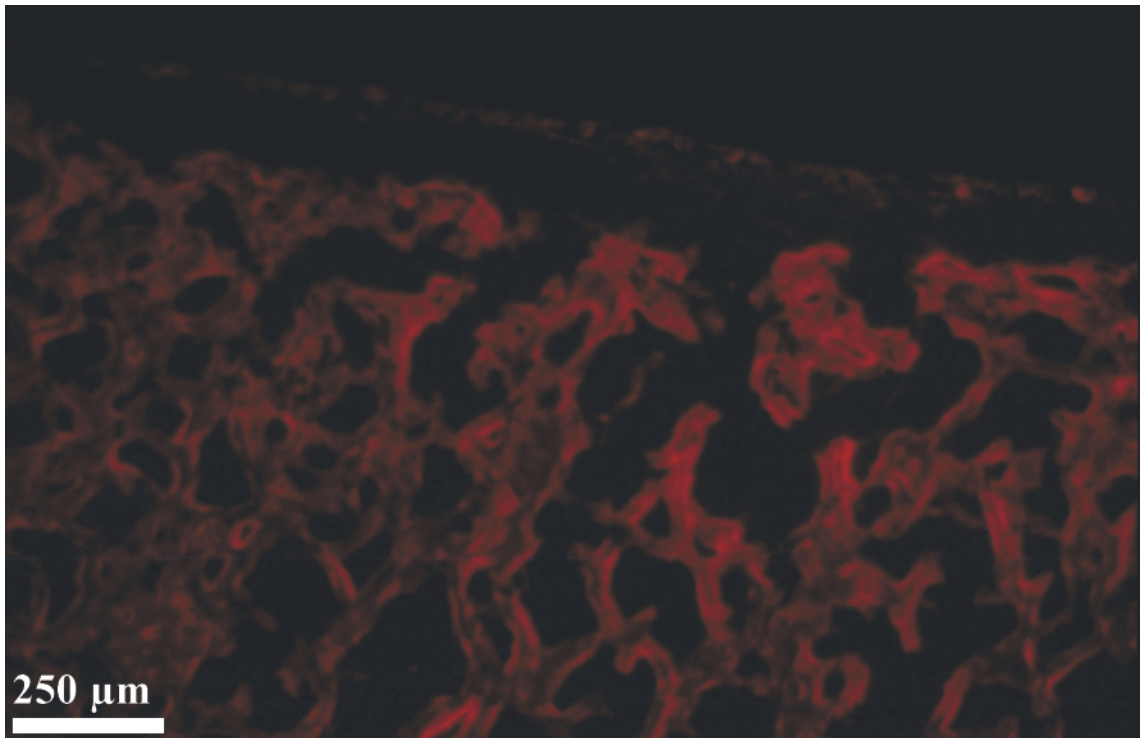


Abb. 32: Fibronectin-Nachweis einer organotypischen Co-Kultur nach 14tägiger Inkubation in dem dreidimensionalen Zellkultivierungssystem „Kleine Box“.

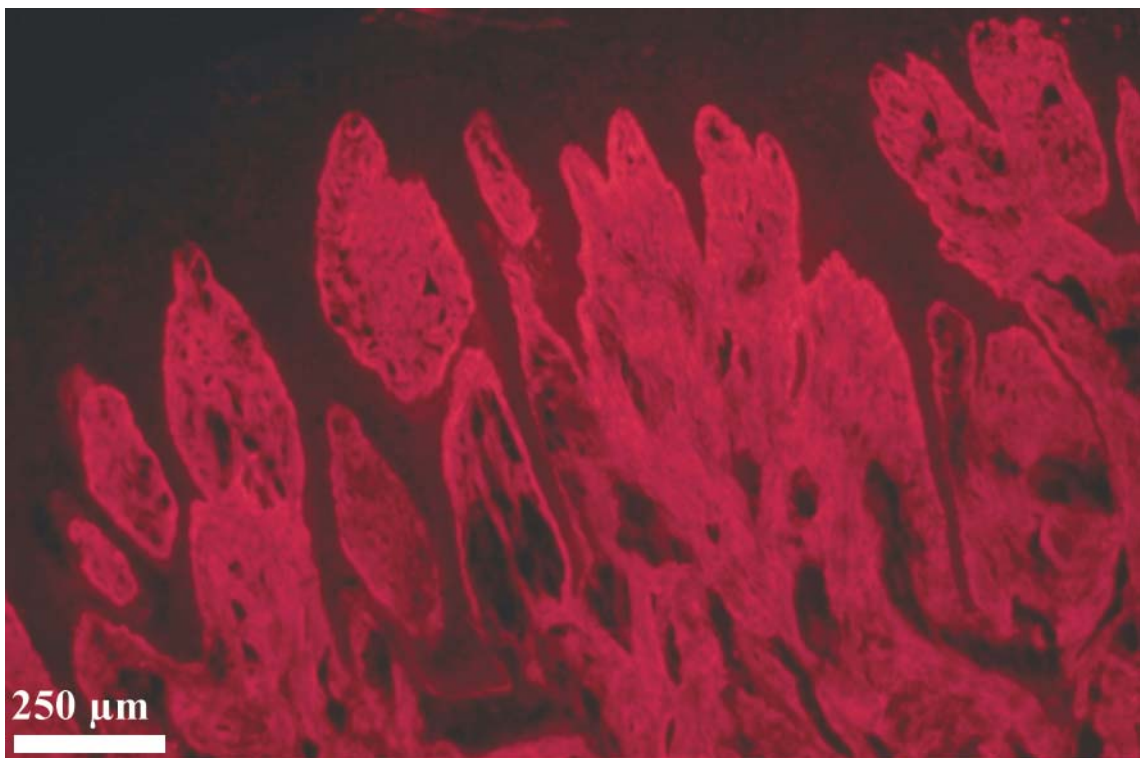


Abb. 33: Immuncytochemischer Fibronectin-Nachweis der physiologischen Mundschleimhaut.

4.2.2.10 Nachweis von Tenascin

Das Polypeptid Tenascin gehört ebenfalls zu den Komponenten der ECM und ist neben der Zelladhäsion auch an Zellprozessen beteiligt, welche die Morphologie sowie Differenzierung der Zellen entscheidend beeinflussen. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 19 zusammengefaßt.

Tabelle 19: Nachweis von Tenascin der organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen

Kultivierungstag	Färbeergebnis
4	+
7	++
10	++
12	+++
14	+++
16	++

Die immunocytochemische Untersuchung zeigte, daß bei allen entnommenen organotypischen Co-Kulturen humaner Mundschleimhaut die Expression von Tenascin auf die „Fütterschicht“ begrenzt war, wobei die Stärke des Fluoreszenzsignals an den verschiedenen Kultivierungstagen deutlich variierte. Parallel zu den abgeschlossenen Untersuchungen wurden die besten Resultate nach 12-14tägiger Anzüchtung des humanen Materials in dem modifizierten Zellkultivierungssystem erzielt (siehe Abb. 34). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse war es denn auch nicht verwunderlich, daß die Intensität der Fluoreszenz, die als Maß für die Expression dieses biochemischen Markers fungierte, sich am 16. Kultivierungstag merklich abschwächte. Als „Bezugsgröße“ diente wiederum parallel aufgearbeitetes, gesundes Humangewebe der Mundhöhle (siehe Abb. 35).

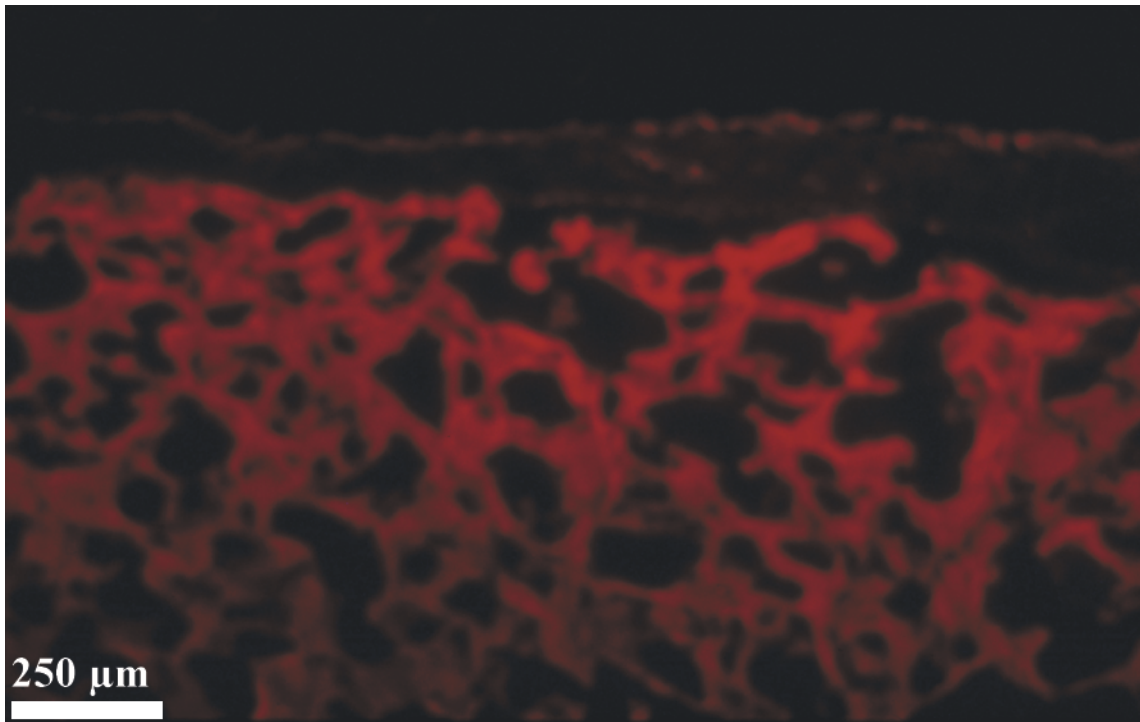


Abb. 34: Immuncytochemischer Nachweis von Tenascin an einer 14 Tage kultivierten organotypischen Co-Kultur.

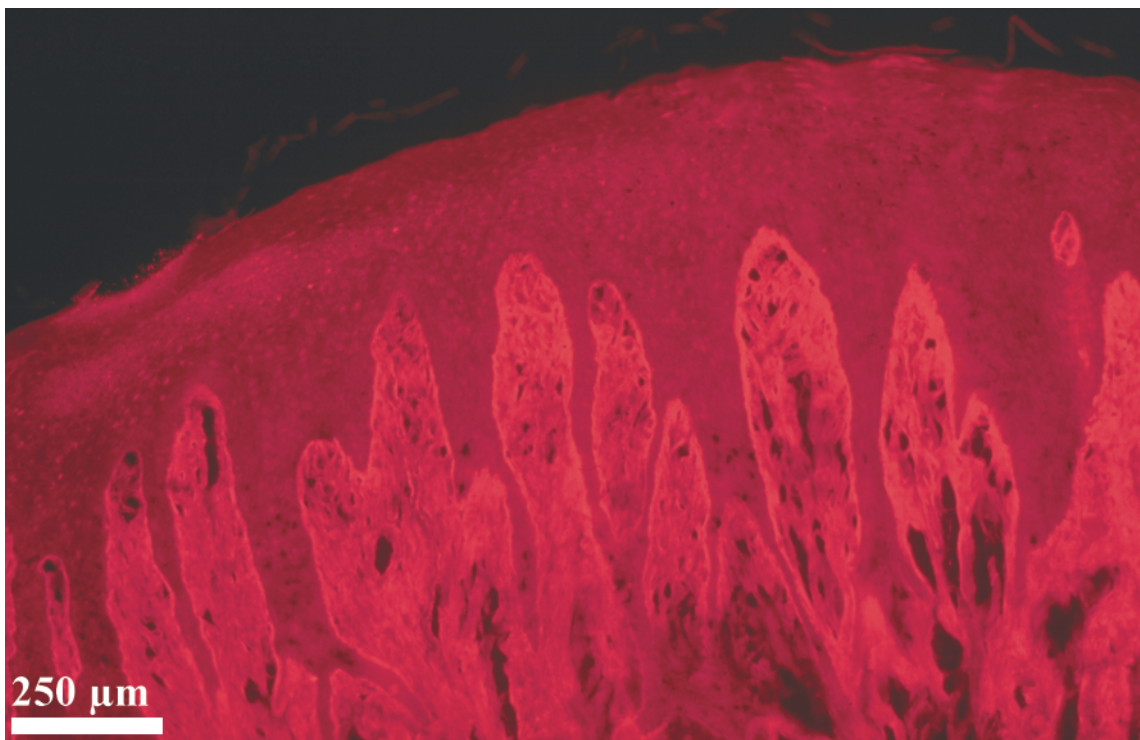


Abb. 35: Nachweis von Tenascin an einem Gefrierschnitt der humanen Mundschleimhaut; als Methode wurde die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

4.3 Organotypische Co-Kulturen der „Großen Box“

4.3.1 Allgemeine Vorbemerkung

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Kultivierung einer künstlichen Mundschleimhaut nicht nur hinsichtlich ihres physiologischen Zustandes, sondern auch in Bezug auf möglichst große Flächen zu optimieren. Daher sind im folgenden Ergebnisse dargestellt, die Ausschnitte aus Mukosakulturen in der „Großen Box“ mit Arealen bis zu $4,9 \text{ cm}^2$ zeigen. Im Gegensatz dazu entstammten die bisher präsentierten Mikroskopfotografien aus den Kulturen in der „Kleinen Box“ mit Flächen von lediglich $1,3 \text{ cm}^2$.

4.3.2 Histologische Charakterisierung

4.3.2.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

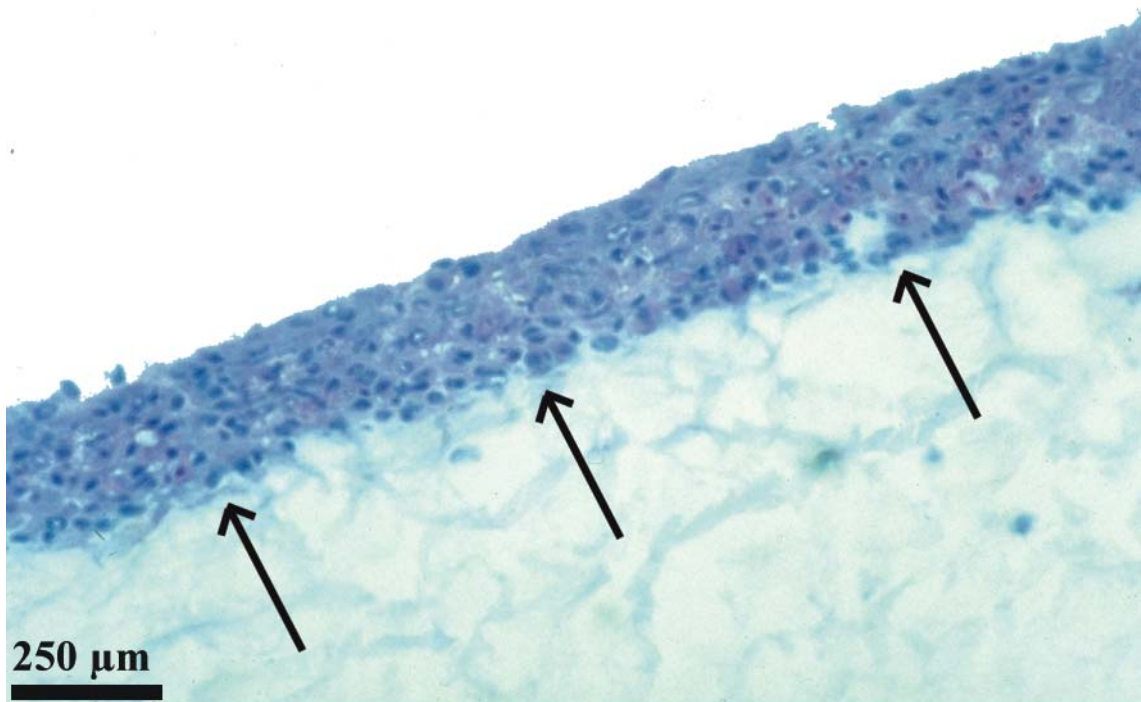


Abb.36: H/E-Färbung einer organotypische Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen nach 14tägiger Kultivierung in der „Großen Box“, wobei die Pfeile die Lokalisation der BM markieren.

Wie Abbildung 36 zeigt, wurde nach 14tägiger Kultivierung in der „Großen Box“ eine homogene „Fütterschicht“ (Collagengel nebst Fibroblasten) beobachtet. Weiterhin hatte das *in vitro* kultivierte Bindegewebe eine dem Nativgewebe vergleichbare weitverzweigte Netzstruktur ausgebildet. Dem Collagengel aufgelagert waren viele epitheliale Zellschichten, die in ihrer Gesamtheit ein kompakt strukturiertes Schleimhautepithel aufbaute. Die Dicke dieser Schicht erreichte annähernd die Ausmaße der physiologischen humanen Mundschleimhaut, die sich in der Regel in einer Größenordnung von 300 bis 500 μm erstreckt.

4.3.2.2 PAS-Färbung

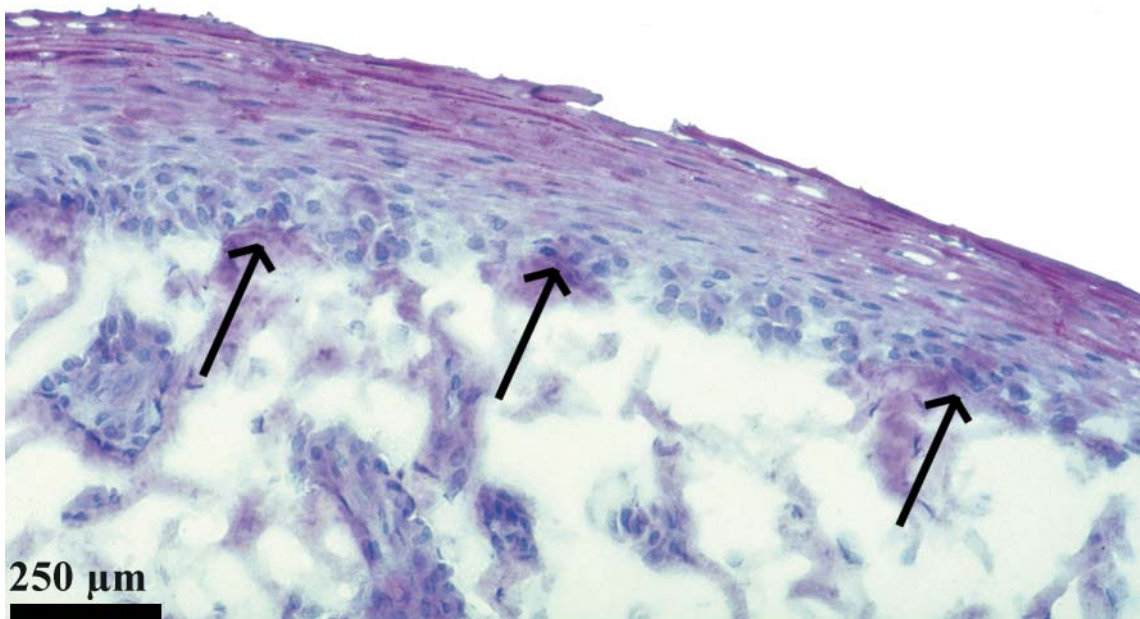


Abb. 37: PAS-Reaktion einer organotypischen Co-Kultur nach 2wöchiger Kultivierung in der „Großen Box“; die Pfeile markieren die BM.

Die „Große Box“ stellt für die Kultivierung der künstlichen Mundmukosa derart günstige Bedingungen bereit, daß nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen der Ansatz einer Basalmembran (Pfeile) mit der PAS-Reaktion nachweisbar war (siehe Abb. 37). Das morphologische Gesamtbild des *in vitro* gezüchteten Gewebes zeigte

wieder eine große strukturelle Ähnlichkeit zu der physiologischen Mundschleimhaut des Menschen.

4.3.3 Immuncytochemische Charakterisierung

4.3.3.1 Nachweis von Cytokeratin 14

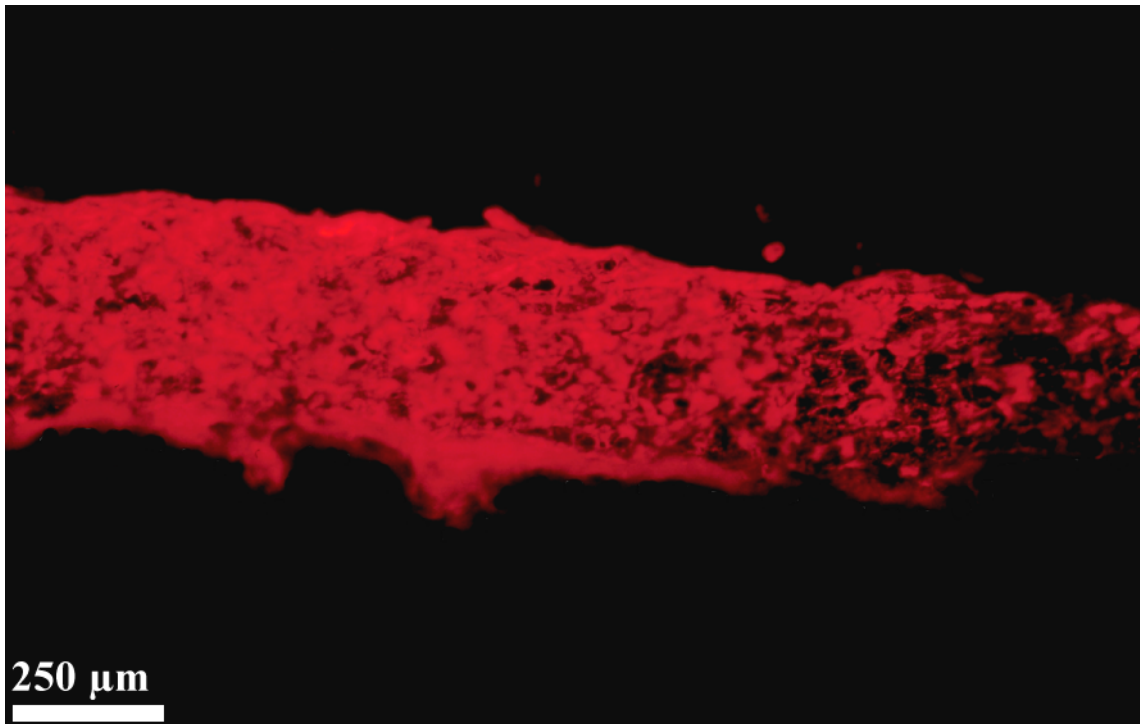


Abb. 38: Immuncytochemischer Nachweis von CK 14 am Gefrierschnitt einer organotypischen Co-Kultur zwei Wochen nach der Kultivierung.

Die immuncytochemische Nachweisreaktion für das Cytokeratin 14 zeigte eindeutig, daß sich mit diesem dreidimensionalen Kultivierungssystem ein kompakt strukturiertes Epithel innerhalb von 14 Tagen züchten ließ (siehe Abb. 38). Die Expression dieses biochemischen Markers erfolgte vergleichbar zur in vivo Situation ausschließlich in den epithelialen Zellschichten. Weiterhin ließ die in vitro gezüchtete humane Mundschleimhaut in Aussehen und Struktur Parallelen zum vitalen Nativgewebe erkennen.

4.3.3.2 Nachweis von Cytokeratin 4

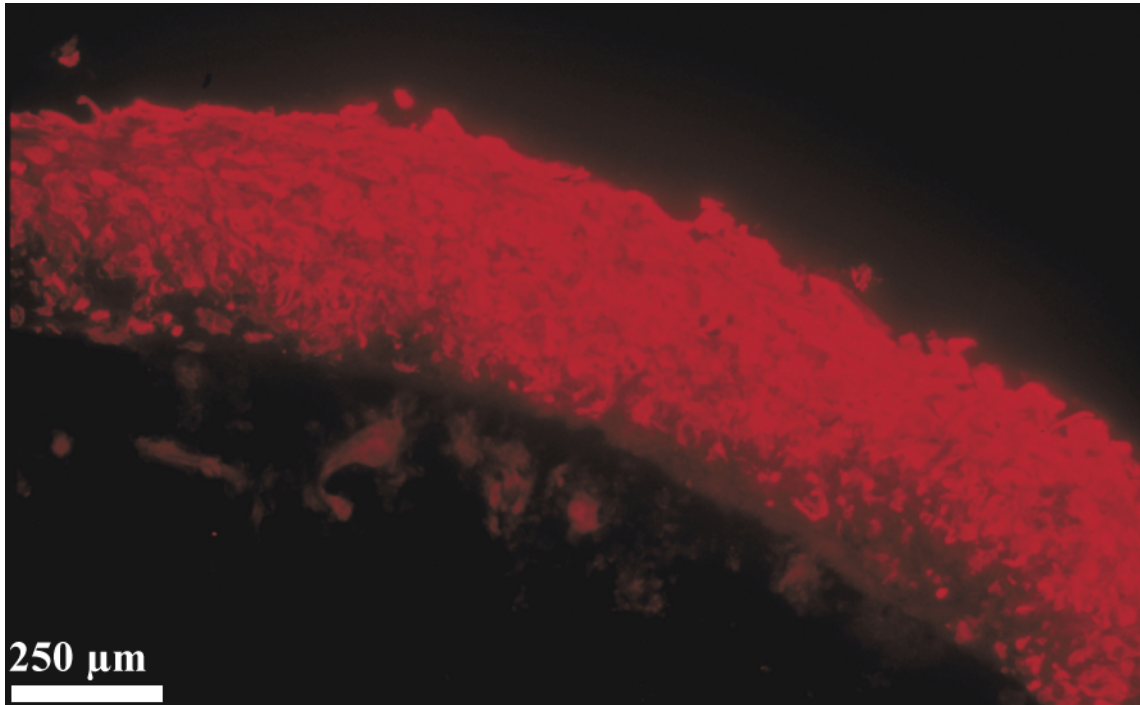


Abb. 39: CK 4-Färbung einer organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen mittels IIF nach 2wöchiger Anzuchtung.

In der oberen Darstellung (Abb. 39) wurde ein 10 μm dicker Gewebeschnitt einer über 14 Tage kultivierten organotypischen Co-Kultur immunocytochemisch auf das Vorhandensein von Cytokeratin 4 untersucht. Wie zu erkennen ist, grenzte sich ein räumlich definierter Bereich deutlich durch eine intensive Fluoreszenz von dem restlichen Gewebe ab. Demzufolge besaß diese Region einen hohen Anteil des differenzierungsspezifischen Cytokeratin 4, dessen Expression während der frühen Differenzierungsphase erfolgt. Da ein positiver Antikörpernachweis als Indiz für die Expression gewertet wurde, zeigte das gezüchtete Humanmaterial bereits zu diesem Zeitpunkt einen entsprechenden Differenzierungsstatus. Weiterhin ist bekannt, daß die Synthese von Cytokeratin 4 *in vivo* nur in der suprabasalen Region des humanen Mundschleimhautepithels erfolgt. Dies konnte auch *in vitro* beobachtet werden. Demzufolge hatte sich in der organotypischen Co-Kultur ein streng organisierter epithelialer Zellverband ausgebildet, vergleichbar dem humanem Originalgewebe.

4.3.3.3 Nachweis von Cytokeratin 13

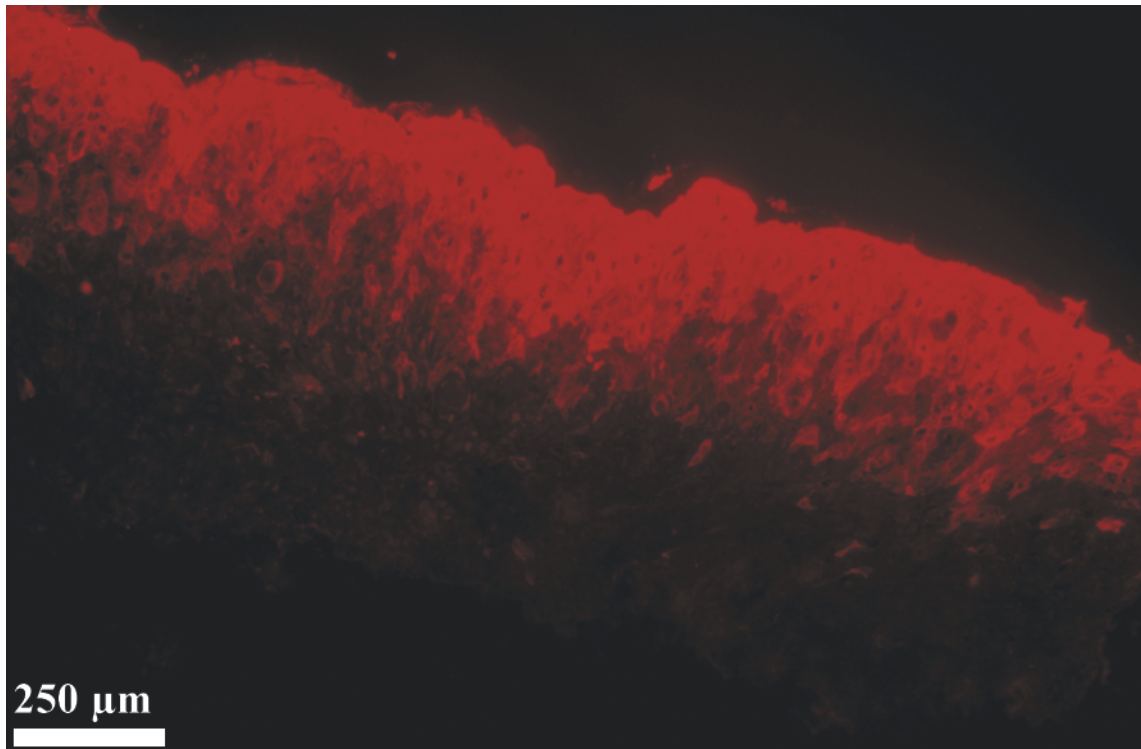


Abb. 40: Fluoreszenz-Darstellung von CK 13 einer organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen nach 14-tägiger Kultivierung in der „Großen Box“.

Das Intermediärfilament Cytokeratin 13 ist eng mit Cytokeratin 4 vergesellschaftet und konnte ausschließlich in der suprabasalen Region des *in vitro* gezüchteten Mundschleimhautepithels nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen nachgewiesen werden (siehe Abb. 40). Da die Expression von CK 13 während der frühen Phase der Zelldifferenzierung stattfindet und den Differenzierungsstatus der Epithelzellen näher charakterisiert, wurde dies wiederum als Indiz für die beginnende Ausdifferenzierung des kultivierten Gewebeverbandes gewertet.

4.3.3.4 Nachweis von Desmoglein 2

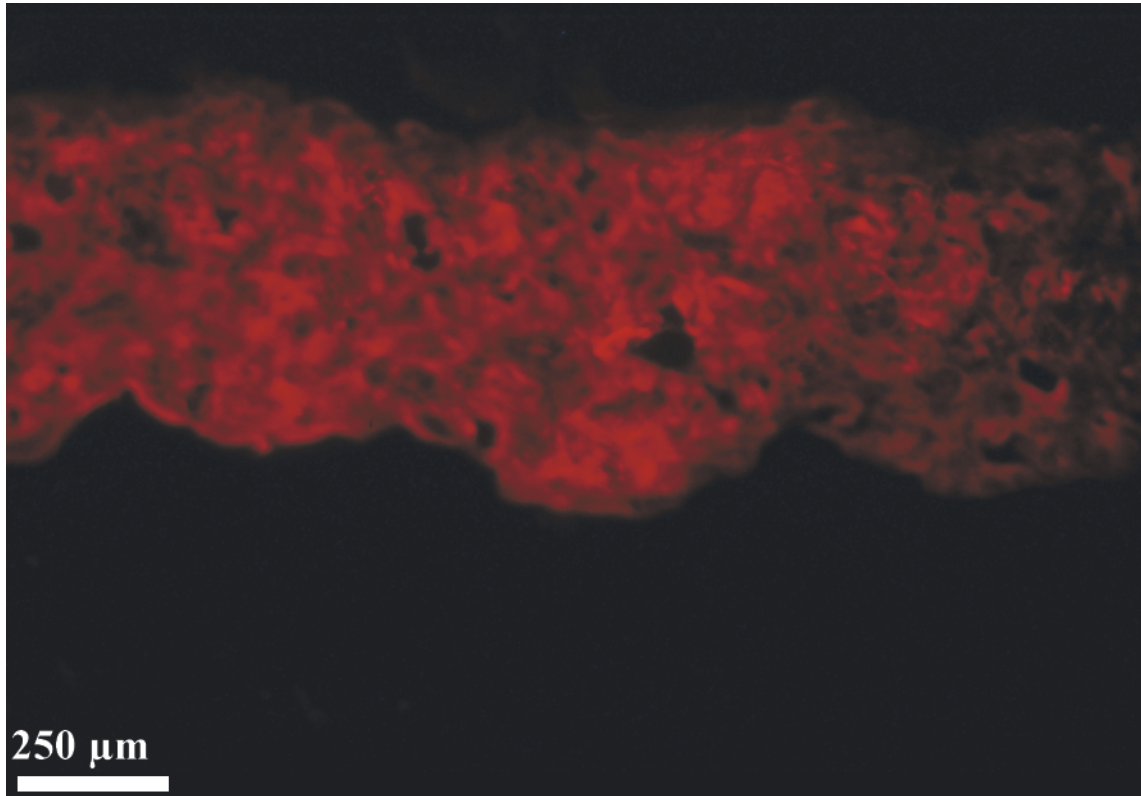


Abb. 41: Immunocytochemischer Nachweis von DG2 am Gewebeschnitt einer in vitro kultivierten organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen (Kultivierungsdauer: 2 Wochen).

Wie Abbildung 41 veranschaulicht, zeigte das komplette Epithel eine positive Nachweisreaktion für Desmoglein 2 nach einer 14tägigen Kultivierung in dem dreidimensionalen System. Da diese biochemische Struktur bekanntermaßen als interzelluläres Bindungselement fungiert und somit die Zell-Zell-Adhäsion unmittelbar beeinflusst, zeigt das Ergebnis daher den in vivo-nahen physiologischen Status des in vitro gezüchteten Gewebeverbands.

4.3.3.5 Nachweis von Desmoplakin 1 und 2

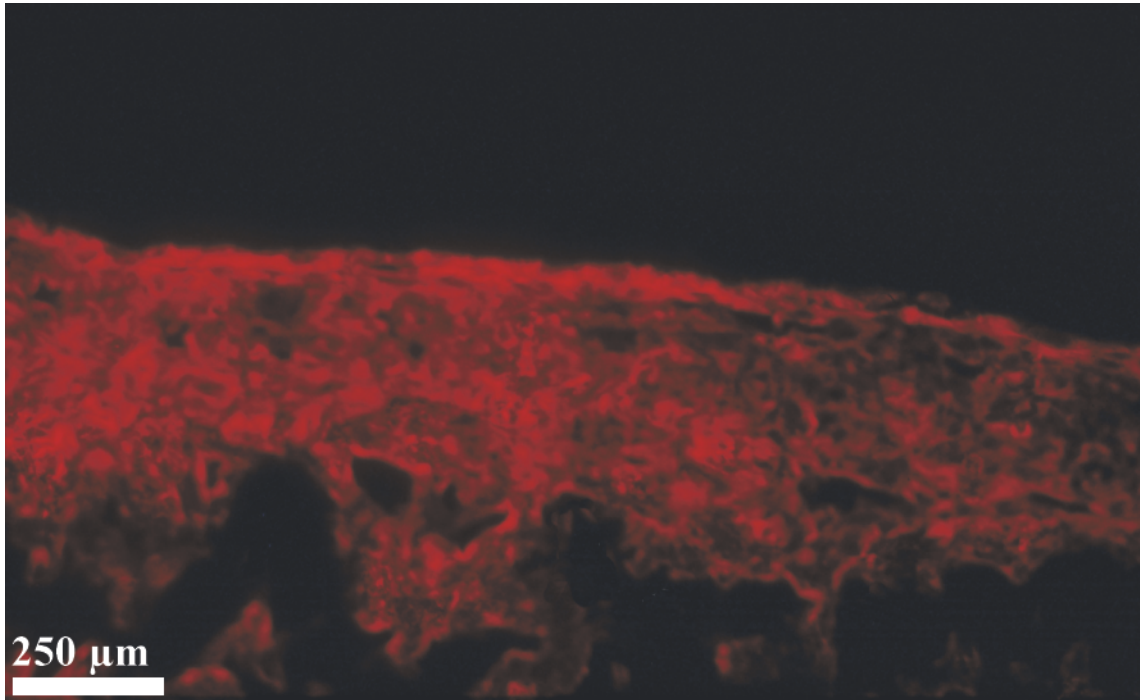


Abb. 42: Nachweis von Desmoplakin 1 und 2 im *in vitro* gezüchteten Humangewebe nach 2wöchiger Kultivierung in der „Großen Box“.

Die Desmoplakine 1 und 2 gehören wie Desmoglein ebenfalls zur Gruppe der Desmosom-assoziierten Moleküle und werden im Zuge der Differenzierung parallel zu Desmoglein 2 von den epithelialen Zellen produziert. Wie Abbildung 42 eindrucksvoll zeigt, konnte auch hier die Expression der Desmoplakine 1 und 2 im gesamten Epithel nachgewiesen werden. Da diese Strukturen unter *in vivo* Bedingungen nur von intakten Zellen synthetisiert werden, mußten die *in vitro* gezüchteten Zellen des Epithelverbandes einen physiologischen Status sehr ähnlich der *In vivo*-Situation besitzen.

4.3.3.6 Nachweis von Collagen Typ IV

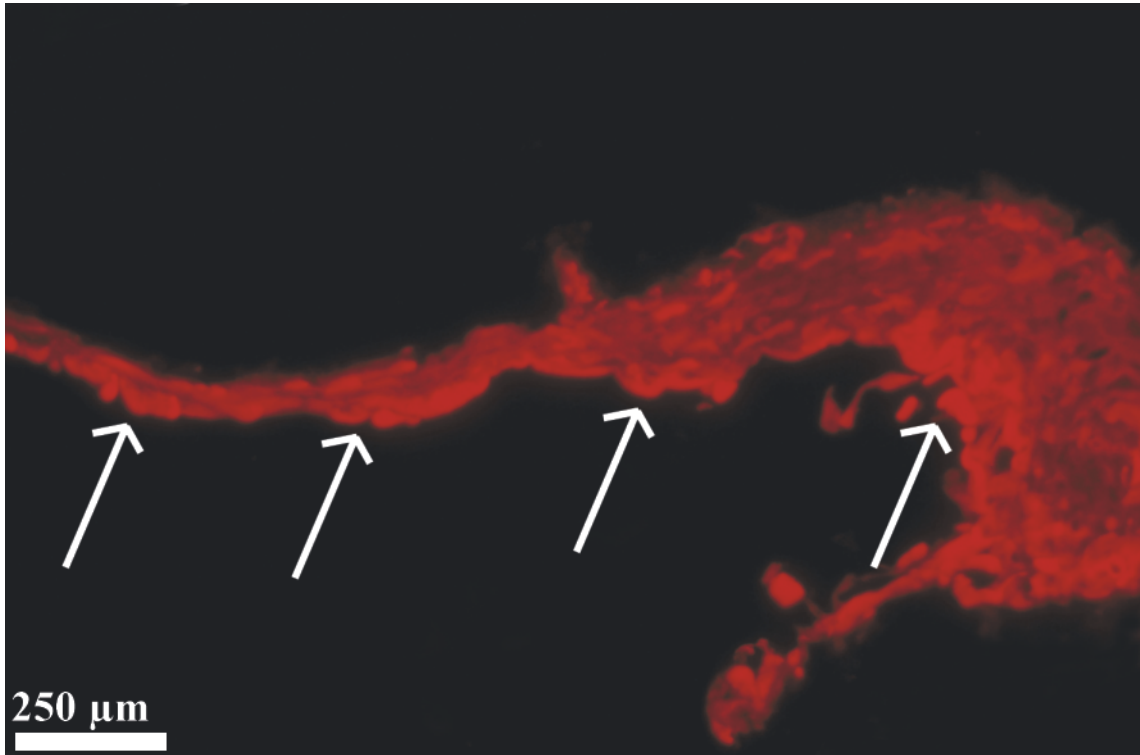


Abb. 43: Immuncytochemischer Nachweis von Coll IV am Gewebeschnitt einer in vitro gezüchteten organotypischen Co-Kultur nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen.

Wie Abbildung 43 veranschaulicht, konnten sowohl in der Grenzzone zum Bindegewebe (Pfeile) als auch in den epithelialen Zelllagen Collagen Typ IV immuncytochemisch nachgewiesen werden. Bezüglich der Intensität der Fluoreszenz zeigten sich aber deutliche Unterschiede. So besaß die basale Region, in der normalerweise auch die Basalmembran lokalisiert ist, im Gegensatz zum Epithel der organotypischen Co-Kultur eine intensivere Färbereaktion. Dies deckte sich mit den Verhältnissen in vivo. Bei den zusätzlich fluoreszierenden Strukturen könnte es sich z. B. um Artefakte handeln, die bei immuncytochemischen Nachweisreaktionen mitunter beobachtet werden.

4.3.3.7 Nachweis von Laminin

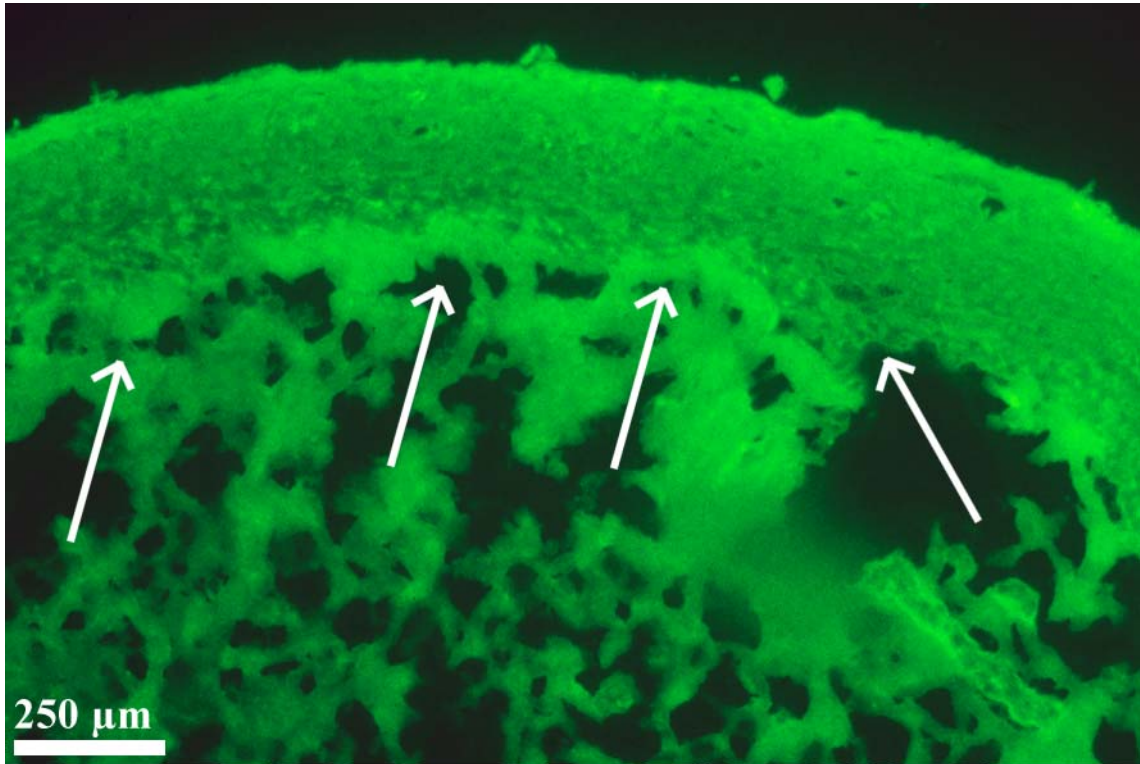


Abb. 44: Laminin-Darstellung an einer 2 Wochen in vitro kultivierten organotypischer Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen (Methode: indirekte Immunfluoreszenz).

Als weitere Hauptkomponente der Basalmembran wurde Laminin in das Testsystem aufgenommen. Dieses Molekül vermittelt unter anderem die Anheftung der Epithelzellen an die Basalzellschicht. Wie aus Abbildung 44 hervorgeht, zeigte im Gegensatz zum übrigen Gewebeschnitt eine schmale Region an der Grenze von Epithel- und Bindegewebe eine intensive Fluoreszenz (Pfeile), d. h. eine positive Nachweisreaktion. Bei den zusätzlich angefärbten Arealen könnte es sich möglicherweise um unspezifische Reaktionen der verwendeten Antikörper handeln, wie die deutliche Intensitätsabnahme der Fluoreszenz anzeigt (siehe hierzu auch die Diskussion, Kapitel 5.2.2).

4.3.3.8 Nachweis von Fibronectin

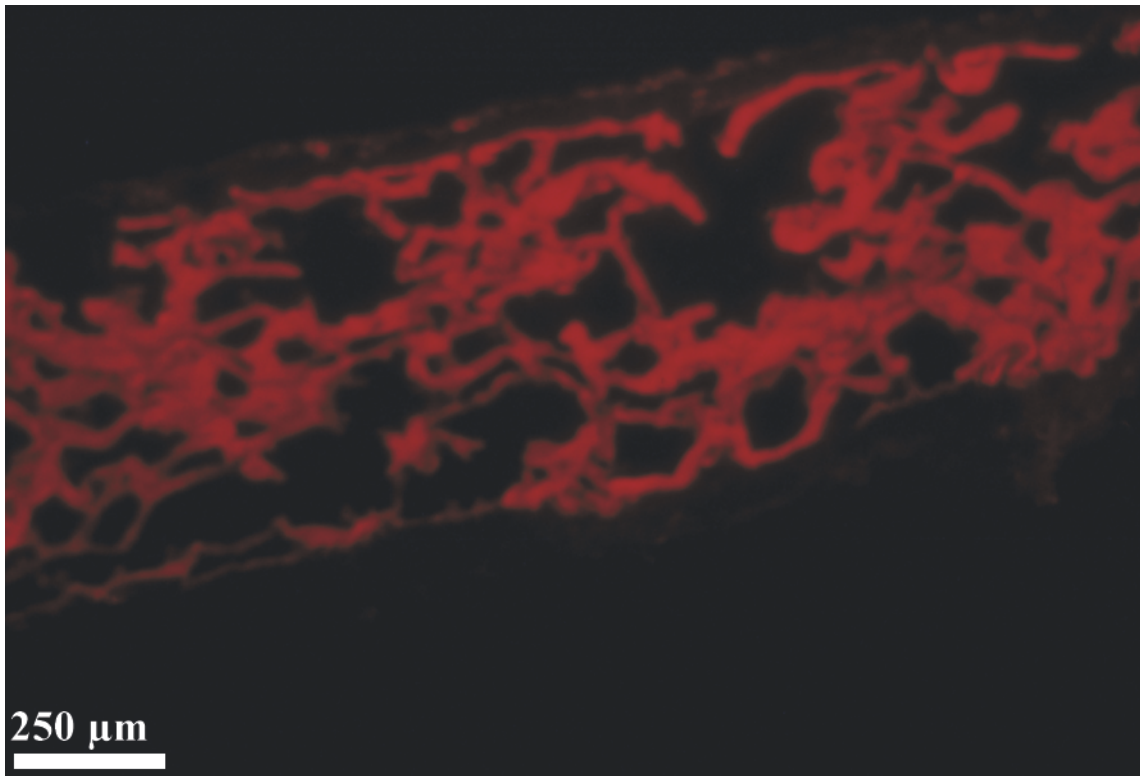


Abb. 45: Nachweis von Fibronectin mit der indirekten Fluoreszenz an einer organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen.

Bei Fibronectin handelt es sich um ein Adhäsionsprotein, das ausschließlich von mesenchymalen Zellen synthetisiert wird. Wie aus der oberen Darstellung (siehe Abb. 40) eindeutig hervorgeht, war die Expression dieses biochemischen Marker parallel zur Synthese *in vivo* ausschließlich auf das Collagengel der organotypischen Co-Kultur humaner Mundschleimhautzellen beschränkt. Dies war nicht verwunderlich, da diese „Fütterschicht“ zusätzlich die isolierten Bindegewebszellen als „mesenchymale Komponente“ enthielt.

4.3.3.9 Nachweis von Tenascin

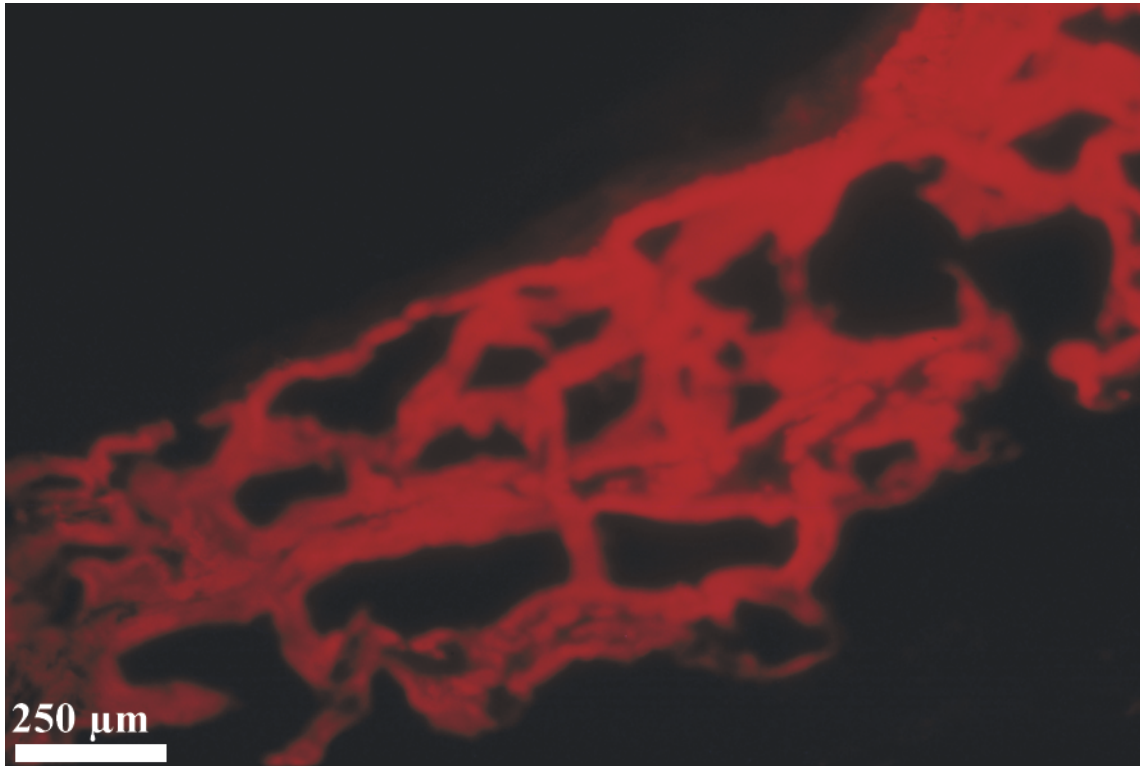


Abb. 46: Immuncytochemischer Nachweis von Tenascin der in vitro gezüchteten Mundschleimhaut nach 14tägiger Kultivierung in der „Großen Box“.

Das detektierte Polypeptid Tenascin gehört ebenfalls zu den Komponenten der ECM und ist neben der Zelladhäsion auch an Zellprozessen beteiligt, welche die Morphologie bzw. die Differenzierung der Zellen entscheidend beeinflussen. Wie schon bei dem Untersuchungsparameter zuvor, konnte dieser Marker nur in der „Fütterschicht“ der organotypischen Co-Kultur nachgewiesen werden (siehe Abb. 46). Diese setzte sich bekanntermaßen aus dem Collagengel und den humanen Bindegewebszellen zusammen. Betrachtet man sich die Expression von Tenascin unter physiologischen Bedingungen, so erfolgt diese ebenfalls ausschließlich durch die Zellen des Mesenchyms (Bindegewebes). Demzufolge wurde auch hier wieder die in vivo Situation reflektiert.

Resümee

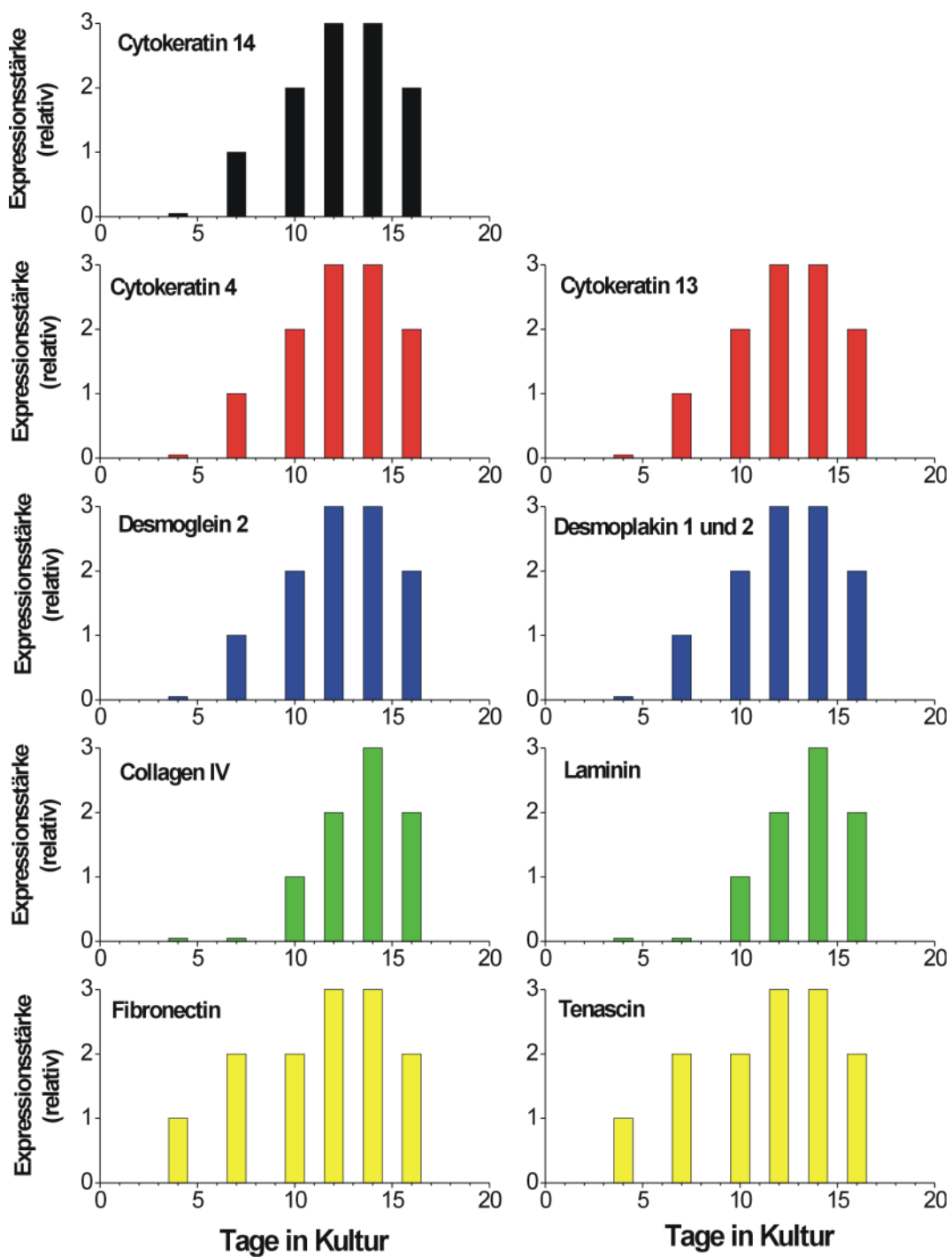


Abb. 47: Ergebniszusammenfassung der organotypischen Co-Kulturen im Säulendiagramm.

aufgetragen sind die relativen Expressionsstärken in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit (Tage in Kultur), wobei die zeitgleich exprimierten Untersuchungsparameter zusätzlich eine Farbkodierung aufweisen.

Wie aus der Abbildung 47 hervorgeht, lassen sich die mesenchymalen Untersuchungsparameter Fibronectin und Tenascin ab dem vierten Kultivierungstag in der organotypischen Co-Kultur nachweisen. Bereits nach einwöchiger Inkubation konnten sowohl der epitheliale Universalmarker Cytokeratin 14 als auch die differenzierungsspezifischen Cytokeratine 4 und 13 immunocytochemisch detektiert werden. Vergleichbare Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen hinsichtlich der desmosomalen Nachweisgrößen Desmoglein 2 bzw. Desmoplakin 1 und 2. Im Gegensatz hierzu ließ sich erst ab dem 10. Kultivierungstag in den dreidimensionalen Systemen die Expression von Collagen Typ IV und Laminin eindeutig nachweisen. Wie die Resultate eindrucksvoll belegen, zeigten alle untersuchten Kenngrößen in den organotypischen Co-Kulturen nach 14tägiger Kultivierung ein Expressionsmaximum und damit einhergehend den höchsten Differenzierungsstatus. Als logische Konsequenz könnte eine mögliche Transplantation der *in vitro* gezüchteten, humanen Mundschleimhaut just zu diesem Zeitpunkt stattfinden.

Die spezifisch entwickelten, dreidimensionalen Zellkultivierungssysteme erlaubten die Anzucht einer physiologisch intakten, humanen Mundschleimhaut mit einem sehr hohen Differenzierungsgrad (Cytokeratinexpression). In ihrer Ausdehnung erreichten die *in vitro* kultivierten organotypischen Co-Kulturen eine Grundfläche von annähernd 5 cm² (Wert bezieht sich auf das Zellkultivierungssystem „Große Box“).

Sie stellen daher abschließend betrachtet eine sehr gute Annäherung an die gewebespezifischen Umgebungsbedingungen der Mundhöhle dar.

4.4 Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens p53

4.4.1 Anealingtemperaturen der verwendeten DNA-Primer von p53

Die Bindung der Primer an die DNA ist für die Optimierung der Spezifität einer PCR entscheidend. Diese Anlagerung vollzieht sich in einem begrenzten Temperaturbereich, der primerspezifisch ist und als Anealingtemperatur bezeichnet wird. Unter Zuhilfenahme der Primersequenz wurde für jedes Primerpaar die Anealingtemperatur rechnerisch ermittelt. Dies geschah durch Aufaddieren der einzelnen Nukleinsäuren, wobei jeder Purinbase (Adenin, Thymin) der Zahlenwert „2“ und jeder Pyrimidinbase (Guanin, Cytosin) der Multiplikationsfaktor „3“ zugeordnet wurde.

Tabelle 20: Errechnete Bindungstemperaturen der p53-Oligonukleotide (a: Forward, b: Reverse)

Primer	Nukleotidsequenz	Anealingtemperatur [°C]
1a	GACACGCTTCCCTGGATTGGC	55
1b	TGCCCTCAACAAGATGTTTTGC	54
2a	GTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCA	56
2b	GAGGTTGGCTCTGACTGTACC	54
3a	TGGCCCCTCCTCAGCATCTTA	54
3b	GAGAGCTGAATGAGGCCTTG	51
4a	CGGCGCACAGAGGAAGAGAATC	57
4b	CCCTTGCTTGCAATAGGTGTGCG	59

Wie aus der Tabelle 20 hervorgeht, differierten die verwendeten p53-Primer sehr stark in ihren Bindungstemperaturen, so daß streng genommen für jedes Primerpaar ein eigene Protokollvorschrift erarbeitet werden müßte. Da aber aus praktischen Gründen die Amplifikation der verschiedenen p53-Fragmente in einem Testansatz und damit bei einer gemeinsamen Anealingtemperatur erfolgen sollte, wurde für jedes Primerpaar ein Temperaturgradient unter Berücksichtigung der errechneten Resultate erstellt, wobei sich der gewählte Temperaturbereich von 49-60 °C erstreckte.

4.4.1.1 Temperaturgradient von p53-Primerpaar 1a und 1b

Die Erstellung des Temperaturgradienten erfolgte mittels PCR und der Verwendung isolierter cDNA humaner Bindegewebszellen. Für jedes Primerpaar wurden zwölf Reaktionsansätze gemäß der Anleitung von 3.7.5 pipettiert und in einem Thermocycler mit Gradientenfunktion bearbeitet. Die elektrophoretische Auftrennung der p53-Genfragmente erfolgte wie bereits in Kapitel 3.7.6 beschrieben. Zur Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte (Gelbanden 2-13) wurden zwei DNA-Standards (Ladder) mit definierten Unterteilungen in 250 Bp (L_{250}) bzw. 100 Bp (L_{100}) mit einer Konzentration von 1 μ g in die freien Geltaschen 1 und 14 pipettiert.

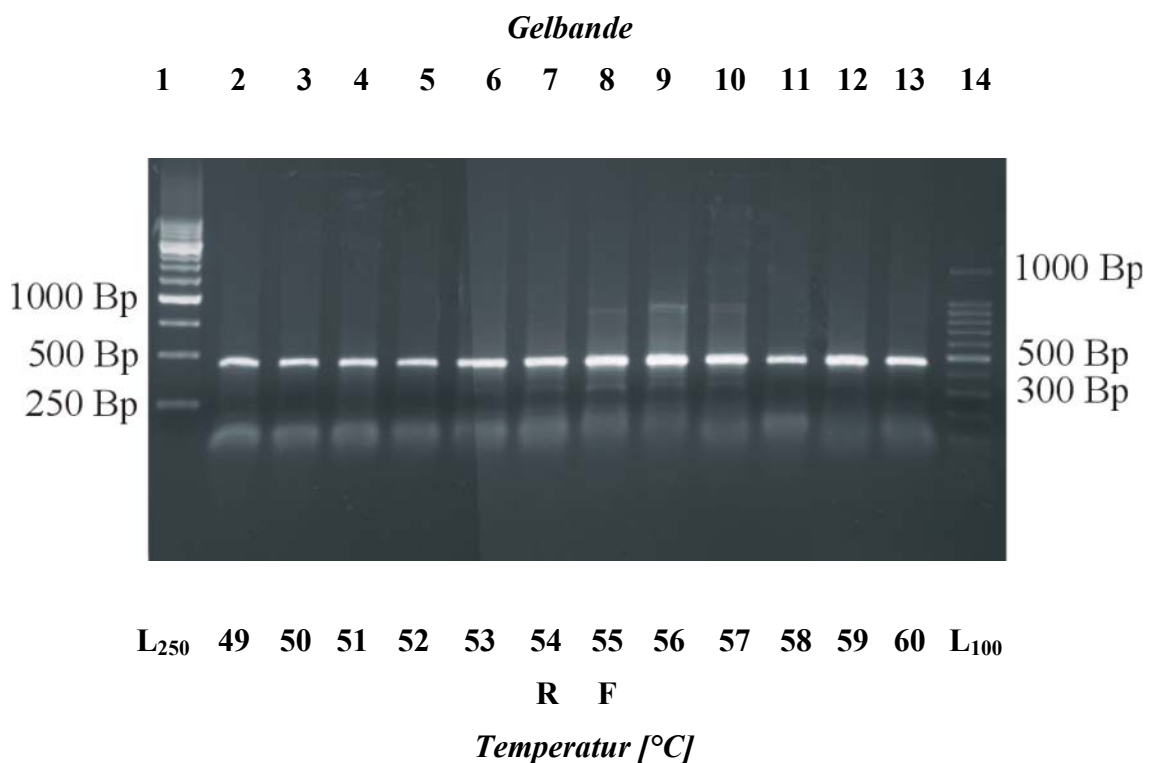


Abb. 48: Temperaturgradient von p53-Primerpaar 1, wobei „R“ und „F“ die errechneten Annealingwerte des betreffenden Reverse-Primers bzw. Forward-Primers kennzeichnen.

Im Bandenmuster des Agarose-Gels zeigte sich über das gesamte Temperaturspektrum eine ausgeprägte DNA-Bande von gleicher Intensität und Größe (siehe Abb. 48). Nach Abschätzung des Molekulargewichts unter Zuhilfenahme der beiden Größenstandards mußte es sich um das spezifische 448 Bp-umfassende p53-Fragment F1 handeln.

4.4.1.2 Temperaturgradient von p53-Primerpaar 2a und 2b

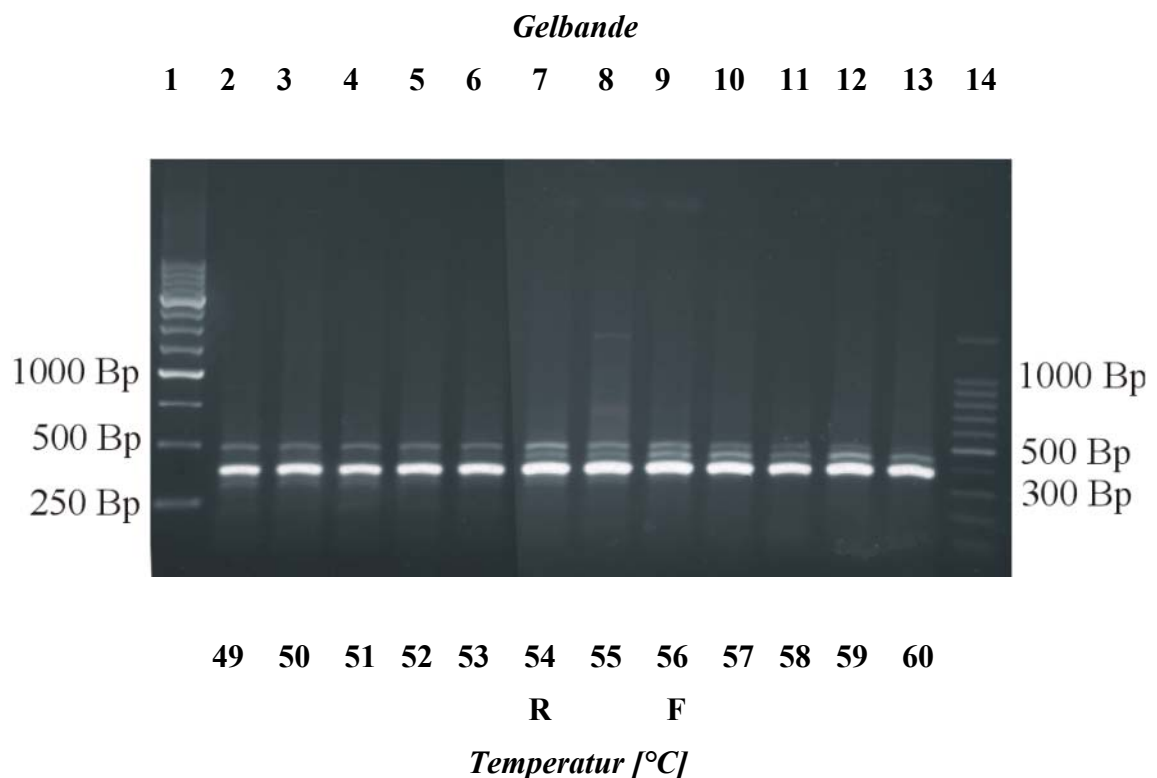


Abb. 49: Temperaturgradient von p53-Primerpaar 2, wobei „R“ und „F“ die errechneten Anealingwerte des entsprechenden Reverse-Primers bzw. Forward-Primers hervorheben.

Wie die fotografische Darstellung des Temperaturgradienten von p53-Primerpaar 2a und 2b beweist, konnte über den gesamten Temperaturbereich das spezifische 364 Bp-große p53-Fragment F2 als untere Bande mit intensiver Ausprägung im Agarose-Gel nachgewiesen werden (siehe Abb. 49). Anhand des Bandenmuster ließen sich zudem bei allen Temperaturen, die errechneten Anealingwerten von 54 °C und 56 °C eingeschlossen, zusätzliche Amplifikationsprodukte (maximal 2) in einer Größenordnung von 400 bis 500 Bp detektieren. Hierbei handelte es sich, wie die nachfolgende Sequenzierungsanalyse erbrachte, um unspezifische Reaktionsprodukte.

4.4.1.3 Temperaturgradient von p53-Primerpaar 3a und 3b

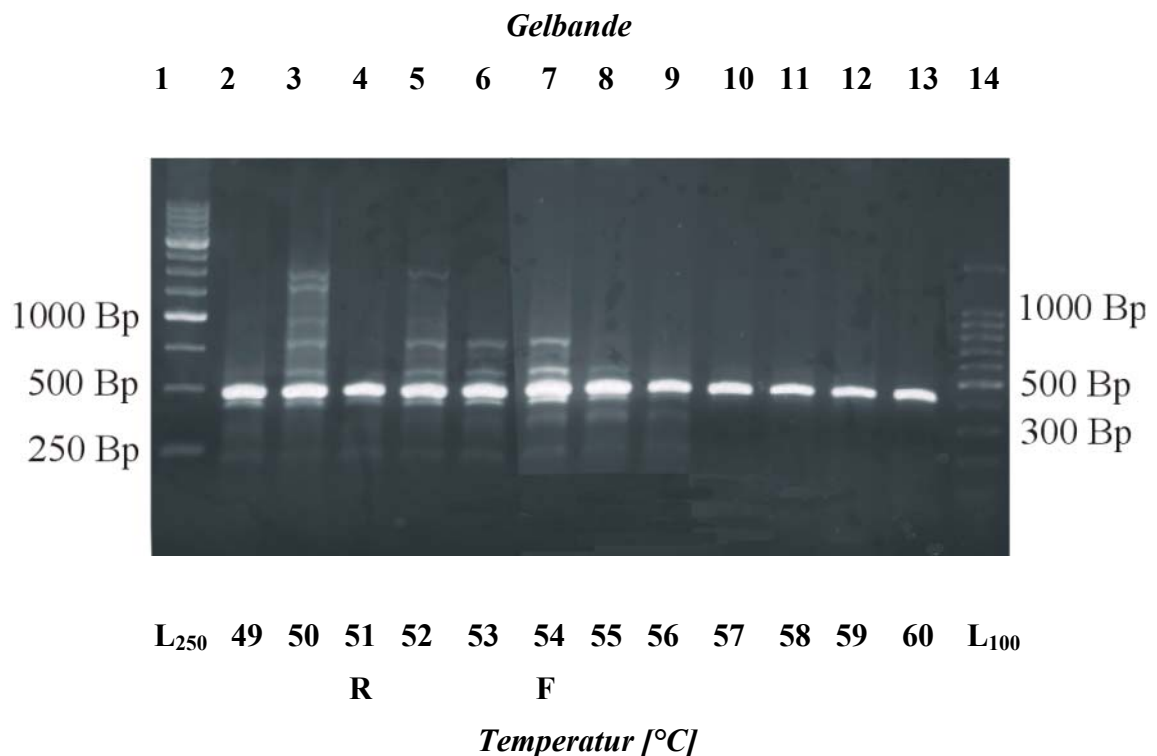


Abb. 50: Temperaturgradient von p53-Primerpaar 3, wobei „R“ und „F“ die errechneten Anealingwerte des entsprechenden Reverse-Primers bzw. Forward-Primers markieren.

Wie aus dem Bandenmuster des Agarose-Gel hervorgeht, traten vor allem bis zu einer Bindungstemperatur von 55 °C zusätzlich zu dem amplifizierten p53-Fragment F3 (477 Bp) eine Reihe von weiteren DNA-Banden unterschiedlicher Molekulargewichte auf. Hierbei dürfte es sich, wie schon bei der Untersuchung zuvor, um unspezifisches Genmaterial handeln. Des weiteren war offensichtlich, daß durch die Erhöhung der Anealingtemperatur die Anlagerung der Primer an Spezifität gewann und sich in dem Temperaturbereich von 56-60 °C nur noch die Amplifikation des spezifischen p53-Genfragments im Gel nachweisen ließ (siehe Abb. 50). Interessanter Weise lagen diese Temperaturwerte deutlich über den errechneten Resultaten von 54 °C für den Forward- bzw. 51 °C für den Reverse-Primer.

4.4.1.4 Temperaturgradient von p53-Primerpaar 4a und 4b

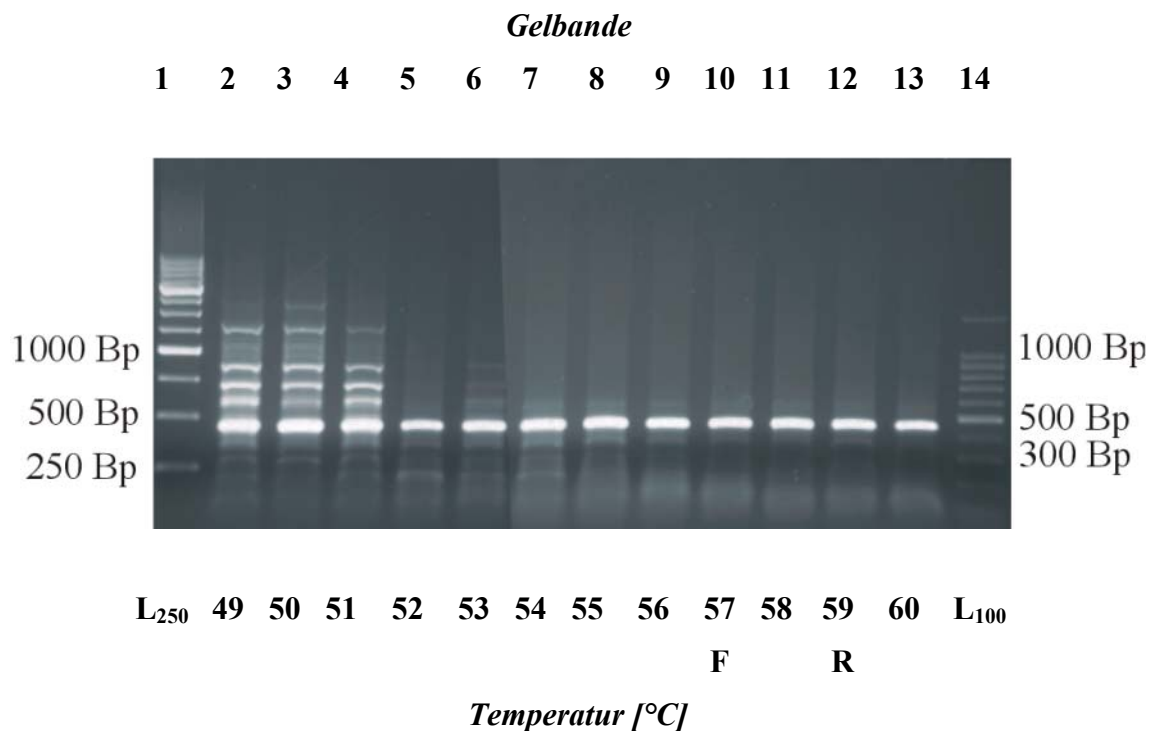


Abb. 51: Temperaturgradient von p53-Primerpaar 4, wobei „R“ und „F“ die errechneten Anealingwerte des jeweiligen Reverse- und Forward-Primers kennzeichnen.

Bei den niederen Temperaturen, insbesondere gilt dies für den Bereich 49-51 °C, amplifizierte das verwendete Primerpaar neben dem spezifischen F4-Genfragment des Tumorsuppressorgens p53 eine Reihe von zusätzlichen PCR-Produkten (siehe Abb. 51). Wurde die Anealingtemperatur erhöht und erreichte schließlich die errechneten Werte (im Bild farblich hervorgehoben), zeigte sich nur noch eine spezifische DNA-Bande von annähernd 450 bp. Hierbei handelte es sich um das spezifische p53-Fragment F4, dessen exakte Größe bei 431 Bp anzusiedeln ist.

Resümee

Nach vergleichender Betrachtung der unterschiedlichen Bandenmuster wurde in den nachfolgenden PCR-Reaktionen für alle p53-Primerpaare eine gemeinsame Anealingtemperatur von 60 °C gewählt.

4.4.2 Amplifikation der p53-Fragmente mittels PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mit cDNA isolierten Humanmaterials der Mundhöhle (native Mundschleimhaut, isolierte Keratinozyten und Fibroblasten aus dem Monolayer) jeweils in einer Dreifachbestimmung gemäß der Anleitung von Kapitel 3.7.5 durchgeführt. Die Auftrennung der verschiedenen Genfragmente erfolgte durch die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.7.6). Um die Molekulargewichte der Amplifikationsprodukte annähernd zu bestimmen, wurde der 100 Bp-Ladder (L₁₀₀) als definierter Größenstandard aufgetragen.

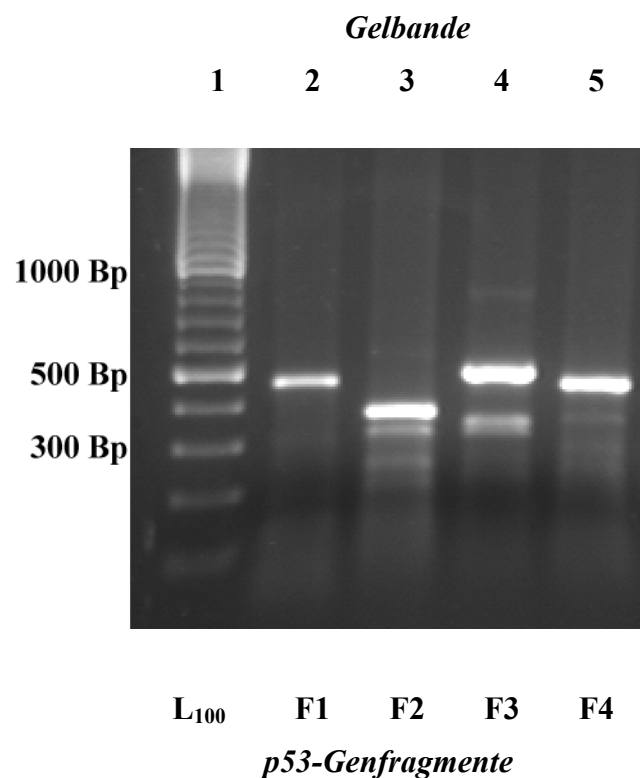


Abb. 52: Mit PCR amplifizierte p53- Genfragmente F1-F4 der nativen Mundschleimhaut.

Wie schon bei den Temperaturgradienten beobachtet, traten auch hier im Bandenmuster zu den spezifischen p53-Genfragmenten weitere Genprodukte im Agarose-Gel auf (siehe Abb. 52). Diese zeigten eine schwächere Intensität und waren daher sehr gut von den intensiv ausgeprägten, spezifischen Gelbanden, die für die nachfolgenden Untersuchungen (SSCP-Mutationsanalyse bzw. Sequenzierung) herausgeschnitten wurden, zu unterscheiden.

4.4.3 SSCP-Mutationsanalyse der p53-Genfragmente

Die SSCP-Mutationsmethode sollte bei den isolierten Gelfragmenten des Tumorsuppressorgens p53 eventuelle Polymorphismen auf der Nukleotidebene aufzeigen. Daher wurden jeweils drei Proben von isolierten Epithel- bzw. Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut und vom physiologischen Nativmaterial untersucht.

4.4.3.1 Humane Mundschleimhaut als Nativmaterial

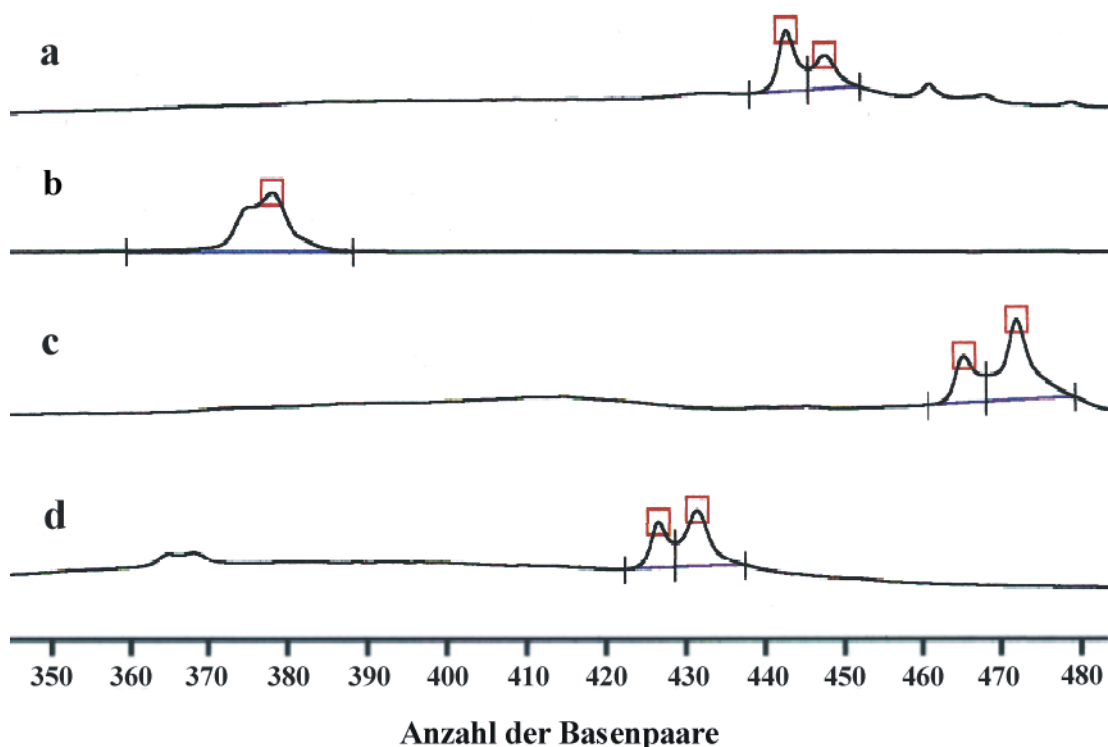


Abb. 53: SSCP-Mutationsanalyse an cDNA von nativer Mundschleimhaut; dargestellt sind die unterschiedlichen Genfragmente des Tumorsuppressorgens p53 als „Größenpeaks“ in der Reihenfolge **a:** p53-Fragment F1, **b:** p53-Fragment F2, **c:** p53-Fragment F3 und **d:** p53-Fragment F4.

Die Allelgrößen der unterschiedlichen Genfragmente von Tumorsuppressorgens p53 entsprachen mit geringfügigen Abweichungen den errechneten Werten (siehe 3.7.4). Interessanter Weise zeigten die Histogramme der Fragmente F1, F3 und F4 in enger Nachbarschaft zu dem spezifischen p53-Genprodukt jeweils einen zusätzlichen Größenpeak auf (siehe Abb. 53), dessen Herkunft und Gensequenz mit der nachfolgenden Sequenzierung bestimmt werden sollte.

4.4.3.2 In vitro kultivierte Epithelzellen der Mundmukosa

Auch hier zeigte die angewandte Methode, daß die erhaltenen Allelwerte bezüglich ihrer Größe nur geringfügig von denen des jeweiligen Genproduktes abwichen. Während sich das 364 Bp-umfassende F2-Fragment ausschließlich als einheitliche „Erhebung“ darstellte, wurden mit zunehmender Allelgröße, im besonderen Maße galt dies für das 477 Bp-umfassende Fragment F3, wiederum zwei Größenpeaks mit geringem räumlichen Abstand beobachtet. Ob es sich dabei um mutierte Regionen des Tumorsuppressorgens p53 handelte, konnte nur die sequenzanalytische Untersuchung zeigen.

4.4.3.3 In vitro kultivierte Bindegewebszellen der Mundmukosa

Die Auswertung der Ergebnisse der SSCP-Mutationsanalyse brachte bei den isolierten Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Allel- und Fragmentgröße von Tumorsuppressorgen p53. Auch hier zeigten die einzelnen Graphen in ihrem Verlauf ein variierendes Verhalten, das sich durch das Auftreten von ein bis maximal zwei nah beieinander liegende Größenpeaks charakterisieren ließ. Wie schon bei den Resultaten zuvor, sollten mögliche Mutationen mittels Sequenzierung aufgedeckt werden.

4.4.4 Sequenzanalyse der amplifizierten p53-Fragmente

Um die Ergebnisse der SSCP-Mutationsanalyse abzusichern, wurden die isolierten p53-Genfragmente zusätzlich einer abschließenden Sequenzierung unterzogen. Diese sollte eindeutige Gewißheit darüber bringen, ob sich Veränderungen in der genomischen Struktur im Laufe der Kultivierung manifestiert haben.

4.4.4.1 Präparative DNA-Isolierung

Um die DNA des jeweilige p53-Genfragment zu isolieren, wurde die spezifische Bande aus dem Gel entfernt und die darin enthaltene DNA gemäß der Anleitung 3.7.7.2 aufgereinigt. Um den Erfolg der Elution nachzuweisen und die Konzentration des isolierten Materials annähernd zu bestimmen, mußten 1/10 des Probenvolumens sowie 1 µg des Molekulargewichtsmarkers L₁₀₀ elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Abbildung 48 zeigt exemplarisch einen Gelauftrag humaner Mundschleimhaut-DNA nach einer gelungenen Aufreinigung der amplifizierten p53-Genfragmente F1-F4.

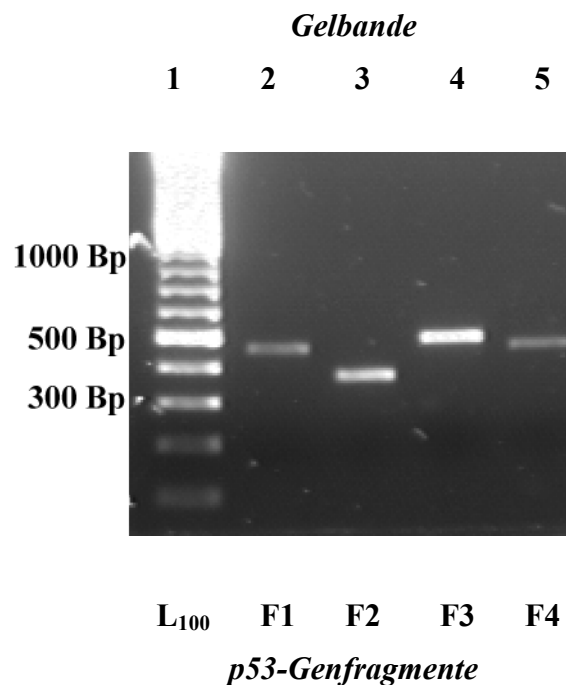


Abb. 54: p53-Genfragmente F1, F2, F3 und F4 der isolierten und in vitro kultivierten Epithelzellen der humanen Mundschleimhaut nach Aufreinigung und Elektrophorese im 1%igen Agarosegel.

4.4.4.2 Humane Mundschleimhaut als Nativmaterial

Diese Untersuchungen fanden im Institut für Genetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz statt. Für jedes Genfragment wurde ein Chromatogramm gemäß der nachfolgenden Abbildung 55 erstellt. Anhand dieser Darstellung ließ sich die Nukleotidsequenz des spezifischen Genprodukts exakt bestimmen. Zur Erleichterung der Auswertung waren die einzelnen Nukleinsäuren zusätzlich farbkodiert.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen der verschiedenen Genfragmente wurden mit der Originalsequenz der cDNA von Tumorsuppressorgen p53, die dem Anhang unter Punkt 7.1 beigelegt wurde, sorgfältig verglichen.

Nach Durchsicht der Nukleotidsequenz für das F1-Fragment von Tumorsuppressorgen p53 konnten bei allen drei Proben weder eine Verschiebung im Leseraster, hervorgerufen z.B. durch Deletion oder Addition, noch ein Basenaustausch detektiert werden. Auch die vergleichende Betrachtung zwischen der „Original-cDNA“ und des 364 Bp-großen F2-Fragments erbrachte das gleiche Resultat, d. h. die Reihenfolge der Nukleotide stimmte komplett überein. Die sequenzanalytischen Untersuchungen der anderen beiden Genprodukte von p53 (F3 und F4) lieferten ebenfalls auf der Nukleotidebene keine Anhaltspunkte für das Auftreten von genetischen Alterationen.

4.4.4.3 In vitro kultivierte Epithelzellen der Mundmukosa

Die Sequenzierung des PCR-Produktes F1 zeigte eindeutig, daß die Nukleotidsequenz dieses Genfragmentes mit der Originalsequenz der cDNA von Tumorsuppressorgen p53 identisch war. Ebenso konnten bei den anderen drei Genstrukturen keine Unregelmäßigkeiten beobachtet werden, die auf ein Mutationsgeschehen hindeuten würden. Demzufolge schienen weder die Isolierung noch die Kultivierung den zellulären Stoffwechsel der epithelialen Zellen hinsichtlich eines vermehrten Auftretens von Mutationen in bezug auf das Tumorsuppressorgen p53 zu beeinflussen.

4.4.4.4 In vitro kultivierte Bindegewebszellen der Mundmukosa

Die erhaltenen Resultate der Sequenzanalysen reflektierten die Ergebnisse der epithelialen Mundschleimhautzellen. So konnten bei keinem der vier Genfragmente des Tumorsuppressorgens p53 Veränderungen in der genomischen Struktur nach Durchsicht der Nukleotidsequenzen von Abbildung 55 beobachtet werden.

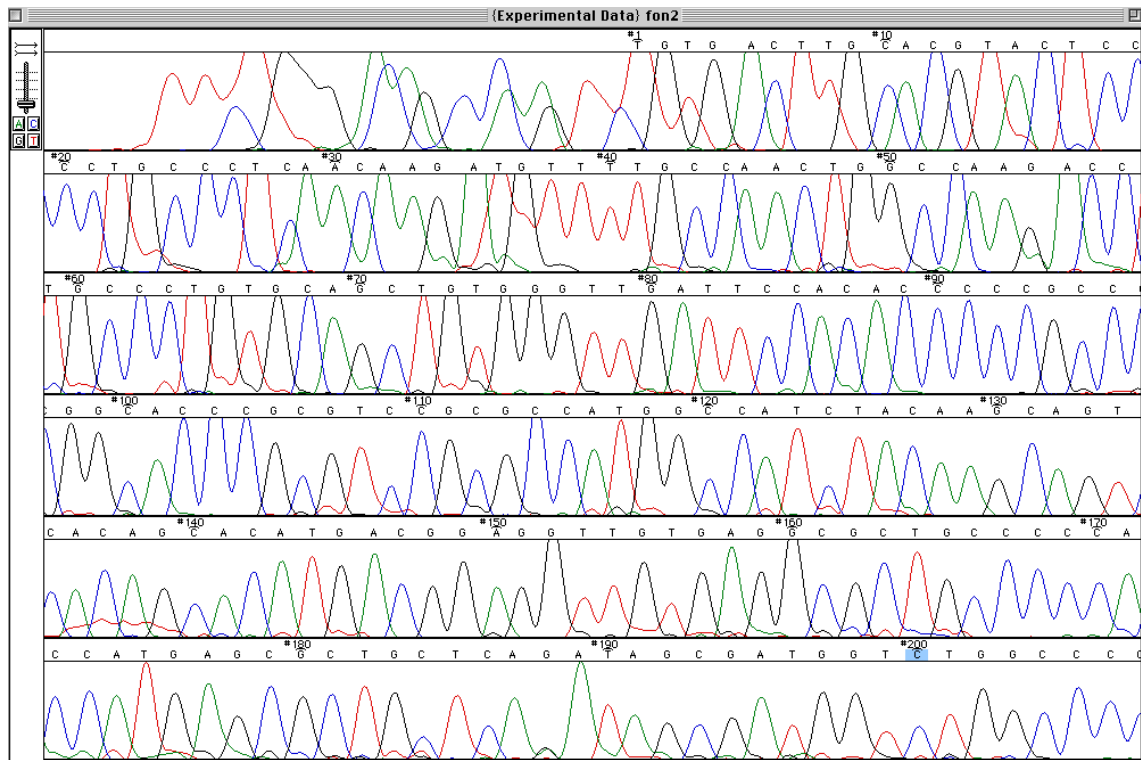


Abb. 55: Ausschnitt der Nukleotidsequenz von p53-Fragment F2 isolierter Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut; hier als Chromatogramm dargestellt. Aufgetragen sind in jeder Spur die vier farbkodierten Nukleotidbasen Adenin (grün), Thymin (rot), Cytosin (blau) und Guanin (schwarz).

Resümee

Wie die Untersuchungsergebnisse zeigen, konnten bei den isolierten und in vitro kultivierten Mundschleimhautzellen (Epithelzellen, Fibroblasten/-zyten) keine Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 detektiert werden. Analoge Ergebnisse erbrachte die p53-Mutationsanalyse der nativen Mundschleimhaut, die als interne Vergleichskontrolle herangezogen wurde.

5 Diskussion**5.1 Isolierung und Kultivierung humaner Mundschleimhautzellen**

In der Zellkultur gibt es eine Vielzahl von mechanischen und enzymatischen Arbeitstechniken zur Isolierung humaner Zellen aus Nativgewebe, wobei sehr häufig die Explantatmethode und die Einzelzellensuspensionstechnik angewandt werden. Bei der Explantatmethode wird die Gewebe-Biopsie mechanisch in kleinere Gewebestücke zerkleinert, mit geringem Abstand in der Kulturflasche plaziert und mit Nährmedium versorgt (z. B. Lauer et al. 1997). Im Gegensatz hierzu erfolgt bei der Einzelzellensuspensionstechnik nach der mechanischen Aufarbeitung eine zusätzliche enzymatische Behandlung. Der Zusatz von Proteasen führt zur Zerstörung der interzellulären Bindungen und ermöglicht dadurch ein Herauslösen einzelner Zellen aus dem komplexen Verband (z. B. Tomakidi et al. 1997, Lauer et al. 1997). Dieser Prozeß kann nur über eine begrenzte Zeitdauer durchgeführt werden, da bei zu langer Inkubation mit proteolytischen Enzymen massive Membranschädigungen auftreten, die zum Untergang der Zellen führen.

In dieser Dissertation wurden sowohl die Explantatmethode als auch die Einzelzellensuspensionstechnik zur Isolierung von Epithel- und Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut eingesetzt. Für die Gewinnung der Humanzellen wurde die Biopsie zunächst in Epithel und Bindegewebe separiert. Während die Aufarbeitung des Bindegewebes unter Einsatz der Explantatmethode erfolgte, wurde die Präparation des Epithels mit der Einzelzellensuspensionstechnik durchgeführt. Aus den isolierten Fibroblasten/-zyten ließen sich ohne Schwierigkeiten Primärkulturen anlegen. Im Gegensatz dazu gestaltete sich das Anlegen von Reinkulturen epithelialer Zellen aus der humanen Mundschleimhaut sehr problematisch. Häufig zeigte sich ein zeitgleiches Auswachsen von Fibroblasten und Keratinozyten in den Co-Kulturen. Dieses Problem ist seit längerem bekannt. Daher wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Strategien entwickelt, um die unerwünschten Fibroblasten/-zyten erfolgreich aus epithelialen Kulturen zu entfernen. So versuchte man z. B. durch die Zugabe von spezifischen Enzymen oder Enzymkombinationen ein zeitlich versetztes Ablösen (differentielle Trypsinisierung) der verschiedenen Zellpopulationen zu erzielen. Eine

andere Strategie versuchte den epithelialen Zellen durch Variation des Nährstoffangebotes einen Selektionsvorteil zu verschaffen (z. B. Stark et al. 1999). Mittlerweile sind eine Vielzahl von Spezialnährmedien für die Kultivierung von Epithelien kommerziell erhältlich. Diese sollen laut Angaben des Herstellers zusätzlich das Fibroblastenwachstum hemmen oder gar unterbinden. In einer Reihe von Vorversuchen wurden daher verschiedene Nährlösungen auf diese Selektivität ausgetestet, der Erfolg blieb jedoch aus.

Insgesamt blieben alle Bemühungen, die Bindegewebszellen der humanen Mundschleimhaut mit diesen herkömmlichen Verfahren aus der Keratinozytenkultur vollständig zu entfernen, letztendlich erfolglos. Lediglich durch das frühzeitige Entfernen von betreffenden Gewebeexplantaten konnten epitheliale Zellkulturen mit einem minimalen Anteil von Bindegewebszellen erhalten werden, welche die nachfolgenden Experimente (Herstellung von organotypischen Co-Kulturen) nicht maßgeblich beeinträchtigten. Die hier verwendeten Arbeitstechniken wurden bereits in der Vergangenheit sehr erfolgreich zur Isolierung von Epithelzellen aus der humanen Gingiva angewandt (z. B. Lauer et al. 1997). Die beschriebenen Ergebnisse waren mit denen dieser Dissertation vergleichbar. So wurden aus allen Gewebebiopsien nach der Aufarbeitung mit der Explantatmethode problemlos Primärkulturen erhalten. Betrachtete man weiterhin den zeitlichen Rahmen, in dem ein Auswachsen der ersten gingivalen Epithelzellen beobachtet wurde, so zeigten sich ebenfalls Parallelen zwischen der besagten Studie und den Resultaten dieser Arbeit. Im Gegensatz aber zu den vorliegenden Ergebnissen konnten Lauer et al. (1997) aus keiner Gewebeprobe nach Anwendung der Einzelzellsuspensionstechnik einen epithelialen Gewebeverband züchten.

Die isolierten Mundschleimhautzellen ließen sich weiterhin über einen längeren Zeitraum kultivieren. Im besonderen galt dies für die Bindegewebszellen, die durch die Optimierung der Kultivierungsbedingungen problemlos bis zu drei Monaten (Passage 12) in Kultur gehalten wurden. Im Gegensatz hierzu konnten die Epithelzellen des Oralgewebes im Höchstfall zweimal passagiert bzw. über 28 Tage kultiviert werden. Vergleichbare Resultate erzielte Tomakidi (1997), der unter Einsatz der organotypischen Co-Kultur ein adäquates humanes Zellmaterial bis zu 21 Tagen kultivierte. In einer anderen Studie gelang es, komplexes Gewebe der humanen Gingiva

über drei Wochen in ihrem physiologisch-aktiven Zustand zu konservieren (Lehmann et al. 1997). Zu diesem Zweck befestigten die Wissenschaftler die frisch entnommenen Biopsien auf einen Gewebeträger, die dann in einen Kulturcontainer eingelegt wurden. Diese Kammern ermöglichten eine wirklichkeitsnahe Simulation der gewebetypischen Umgebungsbedingungen. Unter Einsatz der Perfusionstechnik erfolgte die Versorgung der Kulturen mit unverbrauchtem Medium bei gleichzeitiger Abführung von Stoffwechselprodukten. Wie die Ergebnisse belegten, behielten die Biopsien über den gesamten Beobachtungszeitraum von drei Wochen nicht nur ihre strikte histologische Organisation sondern auch eine dem Nativgewebe vergleichbare Expression der relevanten Cytokeratine. Daß eine Langzeitkultivierung von epithelalem Material über diesen Zeitraum hinaus möglich ist, bewiesen Sittinger et al. (1997). Sie haben ein besonderes System entwickelt, welches die *in vitro* Kultivierung humaner Knorpelzellen bis zu einem Monat erlaubte.

Um den isolierten Epithel- und Bindegewebszellen ein optimales Nährstoffangebot zu liefern, wurden den Kultivierungsmedien weitere Supplemente zugeführt. Hierbei handelte es sich vor allem um eine konzentrierte Proteinlösung, die aus fötalem Kälberserum (FCS) bzw. Cosmic Calf (CC) gewonnen wurde. Diese Nährstofflösung enthält neben einer Palette von elementaren Wachstumsfaktoren zudem auch tierisches Protein (Albumin) in großen Mengen. Dieser Zusatz birgt ein nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotential, da dieses Fremdprotein bei späterer Reimplantation in den menschlichen Organismus gelangen (Breidahl et al. 1989) und schwerwiegenden Immunreaktionen auslösen kann. Daß der menschliche Körper gegen bovines Serum immunologisch vorgeht, zeigte bereits eine Studie aus dem Jahr 1988. So reagierten Patienten, nachdem sie mit fötalem Kälberserum gezüchtete Epitheltransplantate erhalten hatten, mit der Bildung von Antikörpern gegen bovines Serumalbumin (Meyer et al. 1988).

Es ist bei der Kultivierung von Zellen und Geweben unabdingbar, auf Zusätze zurückzugreifen, die für den menschlichen Körper kein Gefahrenpotential darstellen, wie es z. B. auch durch das Infektionsrisiko durch BSE (bovine spongiforme Enzephalopathie) gegeben ist. So wurden in der jüngeren Vergangenheit bereits Studien durchgeführt, die komplett auf den Einsatz von fötalem Kälberserum zur Förderung des Zellwachstums zu verzichteten. Lehmann et al. (1997) spannten frisch entnommene

Gingivabiopsien auf einen Gewebeträger. Anschließend kultivierten sie das Humanmaterial 21 Tage mit einer besonderen Perfusionstechnik. Die Gewebeexplantate wurden nach 7, 14 und 21 Tagen morphologisch auf ihre Integrität und immunocytochemisch auf die Cytokeratin- bzw. Proteinexpression untersucht. Wie die Ergebnisse offenlegten, zeigte der kultivierte Epithelverband über den gesamten Beobachtungszeitraum im histologischen Aufbau die physiologische Schichtung von Stratum basale (Basalzellschicht) bis zum Stratum corneum (Verhornung). Auch in der Cytokeratinexpression konnten die Wissenschaftler nach einer Kultivierungszeit von 3 Wochen keine nennenswerten Unterschiede zum physiologischen Nativgewebe beobachten (Lehmann et al. 1997). Allerdings steht der Beweis noch dafür aus, ob sich die Ergebnisse auch mit Zellsuspensionen, wie sie z. B. bei der organotypischen Co-Kulturen verwendet werden, reproduzieren lassen.

In anderen Versuchen wurde das fötale Kälberserum durch autologes Patientenserum ersetzt. Lauer et al. (1997) führten in diesem Hinblick vergleichende Untersuchungen ebenfalls mit epithelialen Zellen der humanen Gingiva durch. Dabei traten nach 18 Kultivierungstagen zwischen den Kulturen der verschiedenen Individuen im Vergleich von autologem Serum zu FCS nur geringfügige Schwankungen im Keratinozytenwachstum auf. Weiterhin zeigten sich zwischen kultiviertem und physiologischem Gewebe keine relevanten Unterschiede bezüglich der histologischen Struktur (mehrschichtiges Epithel) sowie der Immunocytochemie (Lauer et al. 1997).

Aufgrund der aufgezeigten Resultate scheint es möglich zu sein, bei zukünftigen Versuchen gänzlich auf die Verwendung von fötalem Kälberserum oder Cosmic Calf zu verzichten. Alternativ wäre auch im Rahmen der Kultivierung die Verwendung von Serum desjenigen Patienten denkbar, der später das Transplantat erhalten soll. Somit könnte bereits im Vorfeld möglichen Immunreaktionen vorgebeugt werden. Ob sich diese Ergebnisse auch auf die *in vitro* Kultivierung der humanen Mundschleimhaut übertragen lassen, müssen nachfolgende Studien erst beweisen. Bis dato wurde in allen Kultivierungsversuchen der Promotionsarbeit Cosmic Calf-Serum als Wachstumsstimulanz mit großem Erfolg eingesetzt.

5.2 Organotypische Co-Kulturen

5.2.1 Bestandteile des Cytoskeletts

Die komplexe Struktur des Cytoskeletts verleiht der Zelle nicht nur Form und Mobilität sondern auch die Fähigkeit, Organellen anzuordnen und von einem Teil der Zelle in einen anderen zu transportieren. Das Cytoskelett organisiert sich von einer Region nahe des Zellkerns aus. Es setzt sich aus einem Netzwerk spezieller Proteinfilamente zusammen, den Mikrotubuli, den Actin- und den Intermediär-Filamenten (IF). Zu dieser Gruppe zählen die Desmosomen sowie die Cytokeratine, die hauptsächlich bei Zellen epithelialen Ursprungs gefunden werden (Moll et al. 1987a; Steinert und Liem 1990). Die Cytokeratine lassen sich anhand ihrer physiko-chemischen Eigenschaften wie Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt (IP) und immunhistochemischer Charakteristika (z. B. Morgan et al. 1987) klassifizieren. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten unabhängig voneinander, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Cytokeratin-Expression und dem Grad der Zelldifferenzierung besteht (Clausen et al. 1986; van Muijen et al. 1987). So ist bekannt, daß die epithelialen Zellen des nicht-verhornenden Plattenepithels der humanen Mundschleimhaut in den frühen Stadien der Zelldifferenzierung vor allem die Cytokeratine 4 und 13 (CK 4, CK 13) und im geringen Umfang auch Cytokeratin 1 bzw. 10 (CK 1, CK 10) in den suprabasalen Zellschichten exprimieren (Feghali-Assaly et al. 1994; Kautsky et al. 1995; Bloor et al. 1998). Weiterhin korrelierte die Expression der Cytokeratine mit den verschiedenen epithelialen Zelltypen/Zellarten in unterschiedlichen Geweben (O'Guin et al. 1987; Galvin et al. 1989). Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Cytokeratine auch routinemäßig als Indikatoren eingesetzt werden, um den zellulären Ursprung eines gezüchteten Gewebes eindeutig zu charakterisieren (Moll et al. 1982). So wird z. B. Cytokeratin 14 (CK 14) in der Forschung als epithelialer Universalmarker verwendet. Es bildet mit Cytokeratin 5 (CK 5) die Hauptkomponenten des basalen Zellkompartiments im geschichteten Epithel (Purkis et al. 1990). Wie die immunocytochemischen Untersuchungen ergaben, konnten neben den differenzierungsspezifischen Markern Cytokeratin 4 und 13 auch das epithelspezifische Cytokeratin 14 in der in vitro gezüchteten Mundschleimhaut nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Cytokeratin 14, dessen Expression den kompletten Zellbereich oberhalb

des Fibroblasten-Collagengels erfaßte, erstreckte sich die Lokalisation der Cytokeratine 4 und 13 ausschließlich auf die suprabasale Zellregion. Dieses Verteilungsmuster findet sich auch unter physiologischen Bedingungen bei der humanen Mundschleimhaut. Das zeitgleiche Auftreten der differenzierungsspezifischen Marker konnte zuvor bereits bei Untersuchungen von nativer Wangenschleimhaut-Biopsien beobachtet werden (Bloor et al. 1998). Zusammenfassend betrachtet spiegeln die Ergebnisse relativ genau die *in vivo* Situation wider. So hatte sich im Laufe der Kultivierung nicht nur die Proliferation eines komplexen Epithels stattgefunden, sondern es wurde auch bereits ein bestimmter Differenzierungsstatus erzielt. Demzufolge kommen die entwickelten Zellkultivierungssysteme den gewebetypischen Umgebungsbedingungen der humanen Mundschleimhaut sehr nahe.

Des Weiteren wurde die *in vitro* gezüchtete Mundschleimhaut auf das Vorhandensein der desmosomalen Strukturen Desmoglein 2 (DG 2) und Desmoplakin 1 und 2 (DP 1&2) immunocytochemisch getestet. Bei den Desmosomen handelt es sich um interzelluläre Bindungselemente, die mit Intermediärfilamenten verbunden sind und welche die Zell-Zell-Adhäsion in Epithelien maßgeblich beeinflussen (Shinohara et al. 1998). Der Mechanismus ihrer Wirkungsweise ist sehr komplex. So ist auf der cytoplasmatischen Seite der beteiligten Plasmamembran ist ein sogenannter „cytoplasmatischer Plaque“ lokalisiert, der sich aus einer Vielzahl von Desmoplakin-Molekülen zusammensetzt. Hieran lagern sich die Desmoglein-Moleküle an und treten über ihre extrazellulären Domänen miteinander in Wechselwirkung, wodurch die benachbarten/beteiligten Plasmamembranen wiederum zusammengehalten werden (Alberts et al. 1990). Wie die immunocytochemischen Untersuchungen ergaben, besaß das *in vitro* gezüchtete humane Mundschleimhautgewebe auch hier eine dem humanen Vitalgewebe vergleichbare Expression von Desmoglein 2 und Desmoplakin 1 und 2, die nur den epithelialen Bereich der organotypischen Co-Kultur erfaßte. Dies belegt, daß die *in vitro* kultivierten Epithelzellen zu widerstandsfähigen Struktureinheiten verknüpft wurden und somit einen ausgeprägt physiologischen Status besitzen. Im Gegensatz hierzu zeigt nämlich ein pathologisch verändertes Gewebe, wie es z. B. bei vielen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Tumoren der Fall ist, eine deutliche Reduktion oder gar einen kompletten Ausfall in der Expression von Desmoglein 2 sowie den Desmoplakinen 1 und 2 (Shinohara et al. 1998).

5.2.2 Produkte der extrazellulären Matrix (ECM)

Es ist wissenschaftlich nachgewiesen, daß Zellen vor allem während ihrer Differenzierungsphase mit ihrer Umgebung und insbesondere mit anderen Zellen kommunizieren. Bei diesem komplexen Vorgang spielt die extrazelluläre Matrix eine elementare Rolle (Boudreau et al. 1998). Die ECM setzt sich aus einer Vielzahl von nieder- und hochmolekularen Proteinen und Polysacchariden zusammen, die sich zu einem strukturierten Maschenwerk zusammenlagern. Während die extrazelluläre Matrix im Epithel nur spärlich vorhanden ist, denn die Zellen nehmen hier den größten Teil des Gewebevolument ein, besitzt das Bindegewebe einen hohen Anteil an ECM, in die nur vereinzelt Zellen eingelagert sind (Alberts et al. 1990). Diese komplexe Struktur beeinflusst neben der Zelladhäsion und Migration auch das Wachstum sowie den programmierten Zelltod (Apoptose) und damit die Homöostase der Gewebe. Zusätzlich wird der ECM eine Beteiligung an der Modulation von Cytokinaktivitäten und intrazellulären Signalprozessen zugeschrieben. Über die Art und Weise, wie die extrazelluläre Matrix ihre vielfältigen Aufgaben bewältigt, wurde lange Zeit spekuliert. Mittlerweile gilt das Modell der „dynamischen Reziprozität“ als gesichert. Demzufolge interagieren die Moleküle der ECM mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Das hieraus resultierende Signal wird ins Cytoplasma übermittelt und löst dort eine zelluläre Ereigniskaskade aus, die sich durch das Cytoskelett bis zum Zellkern fortpflanzt und mit der Expression von spezifischen Genen endet. Die produzierten Genprodukte interagieren wiederum im Gegenzug mit der extrazellulären Matrix (Bissell et al. 1982).

Eine besonders spezialisierte Form der ECM ist die Basalmembran. Hierbei handelt es sich um eine extrazelluläre Zellscheide bis 1 µm Dicke, die von den Epithelien an der Grenzfläche zum Bindegewebe gebildet wird (zur Übersicht siehe z. B. Alberts et al. 1990). Diese setzt sich aus der Basallamina und der Lamina fibroreticularis zusammen. Die Basallamina zeigt in der Regel einen dreischichtigen Aufbau: Lamina rara interna, Lamina densa sowie Lamina rara externa. Alle Komponenten der Basallaminae sind Produkte der sie umgebenden Zellen. Man unterscheidet derzeit 40-50 Proteine, die sich größtenteils mit immunhistochemischen Methoden nachweisen lassen. Verankert ist die Basallamina an der Zelloberfläche über sogenannte Adhäsionsmoleküle. Die zweite Komponente der Basalmembran ist die Lamina fibroreticularis. Hierbei handelt es sich um ein Geflecht von reticulären Fasern, das einerseits in engem Kontakt zur

Basallamina steht und andererseits eine direkte Verbindung zu dem darunterliegenden Bindegewebe herstellt. Die Funktionen von Basalmembranen sind vielfältig. Sie sind z.B. an der Zellwanderung und der Regulation des Zellstoffwechsels beteiligt und haben direkten Einfluß auf die Zellarchitektur. Die Basalmembran besteht hauptsächlich aus Collagen Typ IV und Laminin. Das Collagen Typ IV-Molekül setzt sich aus drei Untereinheiten, zwei $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Kette zusammen, die wiederum aus 1700 Aminosäuren aufgebaut sind (Hay et al. 1991). Dadurch daß die dreisträngige Helixstruktur an mehreren Stellen unterbrochen ist, besitzt das Collagen Typ IV eine hohe Flexibilität. Es bildet flache und weitverzweigte Netzwerke aus, in dem sich die einzelnen Molekülen mit ihren carboxyterminalen Enden (Extensionspeptiden) zu Dimeren zusammenlagern (Yurchenco et al. 1994); die Stabilisierung dieser Komplexe erfolgt durch die Ausbildung von Disulfidbrücken und kovalenten Querverbindungen. Bei der anderen Komponente der BM, dem Laminin, handelt es sich um ein komplexes Adhäsionsmolekül mit einem Molekulargewicht von ca. 850 kD. Seine drei kreuzförmig angeordneten Polypeptidketten lagern sich zu einem Heterotrimer zusammen, das ebenfalls durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Das Molekül besitzt eine Reihe von Domänen mit unterschiedlicher Funktion. So interagiert es einerseits mit spezifischen Laminin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und andererseits mit dem bereits beschriebenen Collagen Typ IV sowie verschiedenen Integrinmolekülen (Haas et al. 1994). Die Hauptaufgabe von Laminin besteht in der Adhäsion von Epithelzellen an die Basalzellschicht. Weiterhin spielt es in der Induktion und Aufrechterhaltung des differenzierten Status Quo der Zelle sowie der Zellproliferation eine wichtige Rolle (Grant et al. 1989). In dieser Dissertation konnte die Expression dieser beiden biochemischen Strukturen mit der indirekten Immunfluoreszenz in der in vitro gezüchteten Mundschleimhaut eindeutig in der Grenzregion zwischen Epithel und Bindegewebe nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten auch einige der epithelialen Zellschichten die Synthese von Collagen Typ IV und Laminin. Diese Resultate lassen sich in zweierlei Hinsicht interpretieren. Erstens könnte es sich hierbei aufgrund der großen Intensitätsunterschiede der immunhistologischen Färbung um allgemeine Färbeartefakte handeln. Diese ließen sich dadurch erklären, daß es während der immunocytochemischen Färbung zu unspezifischen Reaktionen der verwendeten Antikörper gekommen ist. Für die Laminin-Darstellung wäre dies denkbar, da hier im

Gegensatz zu allen anderen immunocytochemischen Nachweisen aus Kaninchen isolierte Antikörper verwendet wurden, bei denen mitunter unspezifische Reaktionen auftreten können. Selbst durch die Veränderung der Antikörperkonzentrationen konnte dieser „Hintergrund“ nicht beseitigt werden. Dies spricht eher für eine weitere Deutungsmöglichkeit, wonach zum Zeitpunkt der Probenentnahme der gerichtete Transport der beiden ECM-Komponenten Collagen Typ IV und Laminin zur basalen Zellschicht noch nicht abgeschlossen war. Es gibt eine Studie aus dem Jahr 1998, die speziell die Zell-Matrix-Interaktionen untersuchte (Tomakidi et al. 1998). Wie sich herausstellte, benötigte die Mundschleimhaut der humanen Gingiva zur kompletten Rekonstruktion und damit einhergehend den gerichteten Transport von Collagen Typ IV und Laminin zur basalen Region einen Zeitraum von 3 Wochen. Im Gegensatz hierzu betrug die Kultivierung der organotypischen Co-Kulturen in dieser Dissertation jedoch nur maximal 16 Tage. Daß Laminin ausschließlich unter physiologischen Bedingungen in der oralen Mukosa exprimiert wird, konnte zuvor bereits bewiesen werden (Thorup et al. 1994).

Um die Ausbildung einer Basalmembran eindeutig zu identifizieren, wurde zusätzlich die Darstellung mittels der PAS-Reaktion gewählt. Diese Methode bietet den Vorteil, daß sich die Basalmembran im Ganzen durch die starke Kontrastierung der Färbung im lichtmikroskopischen Bild nachweisen läßt. Wie die Ergebnisse eindeutig belegten, zeigte die *in vitro* gezüchtete Humanschleimhaut die Ausbildung einer Basalmembran. Da bekannt ist, daß diese spezielle Struktur ausschließlich von den epithelialen Zellen der basalen Schicht ausgebildet wird, mußte sich demzufolge ein strikt organisierter Zellverband aufgebaut haben.

Als weiterer Bestandteil der extrazellulären Matrix wurde das Adhäsions-Glycoprotein Fibronectin in das Testsystem aufgenommen. Hierbei handelt es sich um ein Molekül von dimerer Gestalt, wobei sich jede Polypeptidkette aus drei kurzen Einheiten von Aminosäuresequenzen aufbaut und ein Molekulargewicht von annähernd 250 kD aufweist (Hynes 1990). Stabilisiert wird dieser Komplex über zwei Disulfidbrücken, die an den carboxyterminalen Kettenenden lokalisiert sind. Fibronectin enthält neben einer Vielzahl von globulären Domänen, zwischen denen flexible Abschnitte lokalisiert sind, eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, die eine Interaktion mit anderen ECM-Molekülen erlauben (Mosher et al. 1991). Fibronectin ist an der Regulation der

Zelladhäsion, Migration und Proliferation beteiligt (Hynes 1990). Zudem wird ihm eine aktive Beteiligung an Entzündungsprozessen, der Wundheilung, der Abwehrreaktionen gegen Mikroorganismen sowie der Entstehung von Thrombosen und von Metastasen zugeschrieben (Romberger 1997). Auch dieses Adhäsionsmolekül ließ sich mit der Immuncytochemie in der *in vitro* kultivierten organotypischen Co-Kultur nachweisen, wobei die Lokalisation auf die Fibroblastenschicht beschränkt war. Die Expression von Fibronectin zeigt wiederum den physiologische Intaktheit des kultivierten Gewebes an. Daß ohne dieses Molekül keine Zellentwicklung *in vivo* stattfindet, konnte George im Tierexperiment eindrucksvoll beweisen (George et al. 1993). Inaktivierte er bei Mäusen das Fibronectin-Gen, so führte dies bereits sehr früh in der Entwicklungsphase (Embryonalphase) zum Tod des Tieres.

Während Laminin und Fibronectin für die Zelladhäsion von elementarer Bedeutung sind, gibt es andere ECM-Moleküle, die sowohl als positive als auch als negative Modulatoren dieses Prozesses anzusehen sind, wie z.B. das Tenascin (Erickson 1993). Dieses komplexe Molekül besteht aus sechs ähnlichen Polypeptidketten/Untereinheiten (210 kD), die N-terminal über Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind gleichsam den Speichen eines Rades, die von einem Zentrum ausgehend in verschiedene Richtungen weisen (Sage et al. 1991). Tenascin beeinflusst neben der Zelladhäsion auch die Zellmorphologie und die Zelldifferenzierung. Wie die immuncytochemischen Untersuchungen ergaben, war die Synthese von Tenascin ausschließlich auf das die Fibroblasten enthaltenen Collagengel limitiert. Demzufolge mußte es sich bei den isolierten Bindegewebszellen wiederum um physiologisch intaktes Zellmaterial handeln.

5.2.3. Systemvergleich und Beurteilung der Züchtungsergebnisse

Nach Durchsicht der Fachliteratur gibt es unterschiedliche Zellkultivierungsmodelle und Kultivierungsmethoden, die eine *in vitro* Anzüchtung von humanen Zellen erlauben (z. B. Minuth et al. 1997, Minchinton et al. 1997, Tomakidi et al. 1998, Fusenig et al. 1994). In der Regel handelt es sich hierbei um dreidimensionale Systeme. Dies hängt damit zusammen, daß die epithelialen Zellen der humanen Mundschleimhaut in den zweidimensionalen Kulturen, wie es z. B. im Monolayer der Fall ist, nur begrenzt essentielle Differenzierungsmarker exprimieren und die charakteristische dreidimensionale Zellarchitektur nicht spontan ausbilden. Diese Prozesse werden *in vivo* durch Zell-Zell-Interaktionen induziert, an denen die Bindegewebszellen maßgeblich beteiligt sind (Coulomb et al. 1989). Um diese Verhältnisse *in vitro* nachzuahmen, wurden Epithel- und Bindegewebszellen in Co-Kultur genommen. In der Vergangenheit fanden häufig 3T3-Fibroblasten Verwendung (z. B. Izumi et al. 1999, Delcourt-Huard et al. 1997). Hierbei handelt es sich um kommerziell erhältliche, mesenchymale Zelllinie der Maus, die durch genetische Veränderung (Bestrahlung) eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit besitzt. Der Einsatz von bestrahlten und zugleich xenogenem Material birgt erhebliche Risiken und ist daher nicht unumstritten. So könnte es durch Interaktionen der unterschiedlichen Zellpopulationen zur Übertragung (Transfektion) vom Fremd-DNA auf gesunde Humanzellen mit unter Umständen letalen Folgen kommen.

Mit weit aus geringeren Risikopotential ist organotypische Co-Kultur behaftet, die bereits in der jüngsten Vergangenheit sehr erfolgreich zur *in vitro* Kultivierung von humanem Gewebe eingesetzt wurde (z. B. Tomakidi et al. 1997, Odioso et al. 1995). Diese Methode hat zwei entscheidende Vorteile. Zum einen sind beide Kultivierungspartner (Epithelzellen und Fibroblasten) autologen Ursprungs und zum anderen stammen sie aus einer Körperregion. Die organotypische Co-Kultur konnte auch in dieser Arbeit sehr erfolgreich zur Züchtung von humaner Mundschleimhaut angewendet werden. Förderlich war auch die Tatsache, daß sich mit dieser Methode ebenfalls Gingivakeratinozyten problemlos kultivieren lassen (z. B. Tomakidi et al. 1997).

Weit aus schwieriger gestaltete sich die Suche nach einem geeigneten dreidimensionalen Zellkultivierungssystem. Etablierte „Züchtungsmodelle“, von denen einige bereits kommerziell erhältlich sind, weisen alle zwei entscheidende Nachteile auf. Erstens erlaubten sie nur eine Art der Kultivierung, entweder als Standkultur (z. B. Tomakidi et al. 1997) oder als Perfusionskultur (Minuth et al. 1997). Ein weiterer Nachteil lag in der normierten Kultivierungsfläche des jeweiligen Systems, die durch den spezifischen Membraneinsatz vorgegeben wurde. Zu diesem Zweck wurde bei der Herstellung der hier entwickelten dreidimensionalen Systeme zusätzlich darauf geachtet, daß sich vielfache Einsatzmöglichkeiten ergaben. So wurde die „Große Box“ mit zwei besonderen Vorrichtungen ausgestattet, die alternativ einen Einsatz als Perfusionsmodell erlaubt. In dieser Dissertation wurde dieses dreidimensionale Zellkultivierungssystem ausschließlich Als Standkultur für die organotypischen Co-Kulturen verwendet. Weiterhin konnte die zu kultivierende Grundfläche durch Austausch der Membraneinsätze variabel gestaltet werden. Wie die Resultate zeigten, konnten auf beiden Arealen humane Mundschleimhaut in vitro gezüchtet werden, das eine dem Nativgewebe vergleichbaren physiologischen Status besaß.

Zusätzlich wurde noch ein weiterer Membraneinsatz speziell für die „Große Box“ entwickelt, der eine zu bewachsene Grundfläche von 50 cm² hatte. In einem initialen Versuch konnte dieser Einsatz bereits auf seine Tauglichkeit überprüft werden, wobei die H/E-Färbung zur Beurteilung des morphologischen Gesamtbildes diente (Daten nicht gezeigt). Die in vitro kultivierte organotypische Co-Kultur zeigte in Aussehen und Struktur Parallelen mit den Kulturen der kleineren Membraneinsätze. So waren die Fibroblasten des Collagengels wiederum zu einem weitverzweigten Netzsystem angeordnet, auf dem sich ein kompakt strukturierter Zellverband aus mehreren Zellschichten gebildet hatte. In nachfolgenden Untersuchungen muß aber noch geklärt werden, ob das in vitro gezüchtete Gewebe ebenfalls ein dem Nativgewebe vergleichbaren Differenzierungsstatus besitzt.

Allen organotypischen Co-Kulturen war gemein, daß sie nach längerer Kultivierungszeit massive Veränderungen im Fibroblasten-Collagengel zeigten. Einerseits kam es zur lokalen Auflösung des weitverzweigten Netzwerkes, und andererseits wurde eine vermehrte Kontraktion der kompletten „Fütterschicht“ beobachtet. Diese Kontraktion wurde auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (z. B.

Yamamoto et al. 2000, Fusenig et al. 1998). und sogar für Forschungszwecke genutzt (z. B. Sumi et al. 2000, Sakamoto et al. 1994). Es gilt mittlerweile als gesichert, daß dieses Phänomen durch Interaktion von Epithel und Mesenchym zustande kommt und im Grunde einen physiologischen Vorgang widerspiegelt. Die Kontraktion birgt allerdings den großen Nachteil, daß das in vitro Gewebe nur über einen definierten Zeitraum von 14 Tagen eine dem Nativgewebe vergleichbare physiologische Integrität besitzt und somit den zeitlichen Spielraum für eine mögliche Transplantation maßgeblich beeinflusst. Es darf weiterhin nicht außer acht gelassen werden, daß es sich bei den verschiedenen Komponenten (Zellen, Gel) um organisches Material handelt und somit Degradierungsprozesse nicht auszuschließen sind. Dennoch wäre es aus Gründen der Flexibilität sinnvoll, eine Methode zu entwickeln, die eine Kultivierung der organotypischen Co-Kultur auch über diese Zeitspanne gewährleistet. Meines Erachtens wäre schon viel gewonnen, wenn sich die Kontraktion des Fibroblasten-Collagengels verzögern oder sogar aufheben ließe.

5.3 Mutationsanalyse von Tumorsuppressorgen p53

Die *in vitro* Kultivierung von humanem Gewebe oder Zellen birgt mitunter ein nicht zu unterschätzendes Risiko. So können z. B. Temperaturschwankungen, ein unzureichendes Nährstoffangebot oder eine ungenügende Versorgung mit Gasen (allen voran O₂) den Zellstoffwechsel massiv beeinflussen und bereits zu genetischen Alterationen führen, die sich anhand spezifischer Nachweisparameter (z. B. Transkriptionsfaktoren) detektieren lassen. In dieser Dissertation wurde daher als Indikator für den physiologischen Status der Zelle das Tumorsuppressorgen p53 einer intensiven molekularbiologischen Untersuchung unterzogen.

Das Tumorsuppressorgen p53 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der von allen Humanzellen konstitutiv exprimiert wird (Lane 1992). Bei dem dazugehörige Genprodukt handelt es sich um ein tetrameres Phosphoprotein, das ein Molekulargewicht von 53 kD besitzt und sich aus den folgenden funktionellen Untereinheiten aufbaut: Transaktivierungsdomäne (aminoterminal), DNA-Bindungsdomäne, Oligomerisierungsdomäne (Tetramerisierungsdomäne) und Regulationsdomäne (carboxyterminal). Das Tumorsuppressorgen p53 und sein Genprodukt sind an vielen elementaren Reaktionen des Zellstoffwechsels aktiv beteiligt, wie z. B. der Tumorsuppression (Zambetti et Levine 1993) und der DNA-Reparatur. Es ist bekannt, daß in Folge von DNA-Schädigungen der p53-Proteinspiegel in der Zelle ansteigt (Lane 1992, Szumiel 1994), wobei vor allem DNA-Strangbrüche diese Akkumulation induzieren (Nelson und Kastan 1994). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor bindet p53 an das WAF1/CIP1-Gen und initiiert somit die Bildung des Genprodukts WAF1/p21 (Furiihata et al. 1995), das durch weitere Interaktionen schließlich die DNA-Replikation inhibiert (z. B. Yonish-Rouach 1996, 1997). Des weiteren ist das Tumorsuppressorgen p53 in der Lage, das Zellwachstum über den Prozeß der Apoptose zu beeinflussen, in dem es auf der einen Seite die Expression von antiapoptotischen Genen und Genprodukten hemmt, und auf der anderen Seite die Synthese von Apoptose fördernden Elementen stimuliert (z. B. Sang et al. 1995, Moll und Schramm 1998). Der Regulationsweg für p53 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben einer reversiblen Phosphorylierung von Serinresten (z. B. Bischoff et al. 1990, Wang und Prives 1995, Meek et al. 1990) bietet die carboxyterminal lokalisierte Regulationsdomäne eine

effiziente Möglichkeit zur regulatorischen Einflußnahme (Clore et al. 1994). Genetische Alterationen von p53 treten in mehr als der Hälfte von allen bekannten humanen Tumoren epithelialen, mesenchymalen, hämatopoetischen, lymphoiden und nervalen Ursprungs auf (z. B. Hollstein et al. 1991/1996; Greenblatt et al. 1994). Die genomischen Veränderungen sind bevorzugt in der sequenzspezifischen Bindungsdomäne und zwar in den hypervariablen Regionen des p53-Genoms lokalisiert. Besonders häufig manifestieren sie sich in den Aminosäuren Arginin₁₇₅, Glutamin₂₄₅, Arginin₂₄₈, Arginin₂₄₉, Arginin₂₇₃ und Arginin₂₈₂ (Cho et al. 1994). Während Mutationen von Arginin₂₄₈ und Arg₂₇₃ zu einem Verlust des Protein-DNA-Kontakts bewirken (Kontaktmutation), führen genetische Alterationen an den anderen vier „Hotspots“ zu massiven Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur von p53 (Strukturmutation). Derartige Veränderungen lassen sich mit spezifischen molekularbiologischen Methoden detektieren, wie z. B. der SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)-Analyse. Die Analyse kann sowohl mit genomischer DNA oder mit cDNA erfolgen (Hayashi 1991). Dieses Verfahren bietet gegenüber den herkömmlichen Nachweismethoden (z. B. Sequenzierung) den Vorteil, daß sich genetische Alterationen (Mutationen, aber auch Polymorphismen) unmittelbar im Histogramm anhand einer Verschiebung des Größenpeaks oder dem Auftreten bzw. Verlust von mehreren Maxima unterschiedlichen Molekulargewichts zeigen. Diese Veränderungen im Laufverhalten beruhen sehr häufig auf einer Konformationsänderung der einzelsträngigen Amplifikationsprodukte. Aufgrund der hohen Effizienz und des geringen Zeitaufwandes wird die SSCP-Analyse zur Detektion von Mutationen im Genom von Tumorsuppressorgen p53 angewendet (z. B. Makino et al. 1992, Sjögren et al. 1996, Sugano et al. 1996). Auch in dieser Arbeit diente diese Methode zum Nachweis von mutiertem p53. Wie die Histogramme aller untersuchten Proben ergaben, waren mit bei der nativen Mundschleimhaut mit Ausnahme von Fragment F2 neben dem spezifischen Genprodukt von definierter Größe zusätzliche Größenpeaks in unterschiedlicher Anzahl von Tumorsuppressorgen p53 zu beobachten. Dies wurde zunächst als ein Indiz dafür gewertet, daß es sich hierbei um Polymorphismen handelte, die von Mutationen herrühren könnten. Um endgültige Klarheit zu bekommen, mußten alle Genprodukte einer Sequenzierungsanalyse unterzogen und die enthaltenen Nukleotidsequenzen mit der Originalsequenz verglichen werden. Wie die

sequenzanalytischen Untersuchungen, besaßen die spezifischen Genfragmente eine 100%ige Homologie bezüglich der Nukleotidsequenz zum Wildtyp.

Im Gegensatz dazu konnten mit den zusätzlichen Amplifikationsprodukten keine vollständigen Sequenzierungsanalysen durchgeführt werden, da sich die verwendeten p53-Primerpaare nur mit sehr geringer Affinität an das Templat anlagerten. Daher wurden diese zusätzlichen Genprodukten als unspezifische Artefakte ohne klinische Relevanz eingestuft, die sich durch die vorangegangenen Reinigungsschritte nicht komplett entfernen ließen. Vergleichbare Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen der im Monlayer kultivierten Bindegewebs- und Epithelzellen der humanen Mundschleimhaut. Auch hier zeigten die Histogramme der SSCP-Mutationsanalyse durchweg mehrere Größenpeaks bei den verschiedenen Genfragmenten von p53. Daß es sich hierbei um unspezifische Amplifikationsprodukte handelte, konnte wiederum durch nachfolgende Sequenzierung bewiesen werden. Durch vergleichende Betrachtung der cDNA der isolierten Zellen mit der Originalsequenz von Tumorsuppressorgen p53 konnte ebenfalls eine komplette Übereinstimmung festgestellt werden. Zusammenfassend betrachtet zeigten die erhaltenen Resultate, daß sowohl die Gewebepräparation und Isolierung der Humanzellen sowie die angewandte Kultivierungsmethode die physiologische Integrität der Bindegewebs- und Epithelzellen unangetastet ließen. Für diese molekularbiologischen Untersuchungen wurden von jedem Probenkontingent drei „Vertreter“ herangezogen. Um die erhaltenen Resultate zu untermauern.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte ein neuartiges dreidimensionales Zellkultivierungssystem etabliert werden, das die gewebetypischen Umgebungsbedingungen der humanen Mundhöhle sehr gut widerspiegelt. Weiterhin besitzt es aufgrund seines konzeptionellen Aufbaus vielfache Einsatz- und Variationsmöglichkeiten. So kann nicht nur die Kultivierungsart (Stand- oder Perfusionskultur) sondern auch die Kultivierungsfläche durch unterschiedliche Membraneinsätze von minimal 1,3 cm² auf maximal 50 cm² variiert werden.

Bei intensiver Betrachtung der erhaltenen Resultate fällt auf, daß das dreidimensionale Zellkultivierungssystem die *in vitro* Züchtung einer humanen Mundschleimhaut mit einem hohen Differenzierungsstatus erlaubte. Weiterhin zeigte das *de novo* kultivierte Gewebe in Aussehen und Struktur viele Gemeinsamkeiten mit dem physiologischen Nativgewebe.

In weiterführenden Versuchen gilt es, diese Ergebnisse weiter zu untermauern. Ein Ziel wird daher sein, die immunocytochemisch detektierten Kenngrößen (Cytokeratine, Bestandteile des Cytoskeletts sowie der ECM) auch quantitativ zu bestimmen. So lassen sich Expressionsunterschiede aufdecken, die möglicherweise die Proliferations- und/oder Differenzierungsphase der organotypischen Co-Kultur beeinflussen. Weiterhin wäre es von Vorteil, zusätzliche Nachweisgrößen in das Testsystem aufzunehmen, die für die Aufrechterhaltung der physiologischen Integrität der nativen Mundschleimhaut von großer Bedeutung sind. Zu denken ist hier im besonderen an die Integrine mit ihren spezifischen Rezeptoren, die gerade bei den Zell-Matrix-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen (z. B. Tomakidi et al. 1999). Von besonderem Interesse sind die β 1- und β 3-Integrine, die bei initialen Kontraktionen des Collagengels eine wichtige Rolle spielen (Cooke et al. 2000). Um die Untersuchungen abzuschließen sollen auch die Interleukinproduktion und die Expression spezifischer Rezeptoren eingehend betrachtet werden (zur Übersicht siehe z. B. Maas-Szabowski et al. 1996, 2000). In wissenschaftlichen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die epithelialen Zellen exprimieren während ihrer Proliferationsphase IL-1 exprimieren. Dieses Cytokeratin bindet im folgenden an seinen spezifischen Rezeptor, der auf der Oberflächen von Fibroblasten/-zyten lokalisiert ist. Letztere synthetisieren darauf den epithelialen Wachstumsfaktor KGF, der nach spezifischer Bindung an seinen Rezeptor

auf der Oberfläche der Epithelzellen, seine umfassende Wirkung entfaltet und die „Reifung“ der Keratinozyten elementar beeinflußt (Maas-Szabowski et al. 1999, 2000). Es wäre daher sinnvoll, einerseits die Konzentration der beiden löslichen Faktoren Interleukin IL-1 und epithelialer Wachstumsfaktor KGF in einem direkten Testsystem nachzuweisen, z. B. auf der Grundlage eines ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Andererseits dürften die spezifischen Rezeptoren dieser Wachstumsstimulanzen interessante Untersuchungsobjekte. Von besonderer Relevanz wäre hierbei ihre Expression, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht. Auf diese Art und Weise ließen sich direkte Eindrücke über die Intensität des epithelialen-mesenchymalen Wechselspiel sammeln, das bekanntermaßen für die Entwicklung und dreidimensionale Architektur eines physiologisch intakten Gewebeverbands von elementarer Bedeutung ist.

6 Literatur

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft 1990, Weinheim.

Atala A, ed. *Use of non-autologous substances in VUR and Incontinence treatment*. Dialogues in Pediatric Urology 1994c; 17: 11.

Atala A, Hendren WH. *Reconstruction with bowel segments*. Dialogues in Pediatric Urology 1994b; 17: 7.

Atala A, Retik A. *Pediatric Urology-Future Perspectives*. In: Krane RJ, Siroky MB, Fitzpatrick JM, eds. *Clinical Urology*. Philadelphia: J.B. Lippincott 1994a; 507-524.

Atala D. *Tissue Engineering in Urologic Surgery*. *Urologic Clinics of North America* 1998; 25: 39-50.

Bischoff JR, Freidman PN, Maeshak DR, Prives C, Beach D. *Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1990; 87: 4766-4770.

Bissell MJ, Hall HG, Parry G. *How does extracellular matrix direct gene expression?* *Journal of Theoretical Biology* 1982; 99:31-68.

Bizios R. *Mini-Review: osteoblasts: an in vitro model of bone-implant interactions*. *Biotechnological Bioengineering* 1994; 43: 582-585.

Bloor BK, Su L, Shrlaw PJ, Morgan PR. *Gene expression of differentiation-specific cytokeratins (4/13 and 1/10) in normal buccal mucosa*. *Laboratory Investigations* 1998; 78: 787-795.

Boudreau N, Bissell MJ. *Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells*. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10: 640-646.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. *Journal of Cell Biology* 1988; 106: 761-771.

Boyce ST, Goretsky MJ, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Rieman MT, Warden GD. *Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns*. *Annual Surgery* 1995; 222: 7433-752.

Breidahl AF, Judson RT, Clunie GJA. *Review of keratinocyte culture techniques: problems of growing skin*. *The Australian and New Zealand Journal of Surgery* 1989; 59: 485-497.

Breitkreutz D, Stark HJ, Plein P, Baur M, Fusenig NE. *Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺*. *Differentiation* 1993; 54: 201-217.

Breitkreutz D, Schoop VM, Mirancea N, Baur M, Stark HJ, Fusenig NE. *Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants*. *European Journal of Cell Biology* 1998; 75: 273-286.

Breitkreutz D, Stark HJ, Mirancea N, Tomakidi P, steinbauer H, Fusenig NE. *Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes – Implication for epidermal homeostasis*. *Differentiation* 1997; 61: 195-209.

Bürger RA, Müller SC, El-Damanhoury H, Tschakaloff A, Riedmiller H, Hohenfellner R. *The buccal mucosal graft for urthral reconstruction: a preliminary report*. *Journal of Urology* 1992; 147: 662-664.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey P, Pavletich N. P. *Crystal structure of a p53 tumor suppressor–DNA-complex: a framework for understanding how mutations inactivate p53*. *Science* 1994; 265: 346-355.

Cilento BJ, Freeman MR, Schneck FX, Retik AB, Atala A. *Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro*. *Journal of Urology* 1994; 152: 665-670.

Claes H, Stroobants D, van Meerbeek J, Verbeken E, Knockaert D, Baert L. *Pulmonary migration following periurethral polytetrafluoroethylene injection for urinary incontinence*. *Journal of Urology* 1989; 142: 821-822.

Clausen H, Vedtofte P, Moe BD, Dabelsteen E, Sun TT, Dale B. *Differentiation dependent expression of keratins in human oral epithelia*. *Journal of Investment Dermatology* 1986, 86: 249-254.

Clore GM, Omichinski JG, Sakagushi et al. *High resolution solution structure of the oligomerization domain of p53 by multi-dimensional NMR*. *Science* 1994; 265: 386-391.

Cooke ME, Sakai T, Mosher DP. *Contraction of collagen matrices mediated by alpha2beta1A and alpha(v)beta3 integrins*. *Journal of Cell Science* 2000; 113: 2375-2383.

Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. *Influence of human dermal fibroblasts on epithelialization*. *Journal of Investigative Dermatology* 1989; 92: 122-125.

Delcourt-Huard A, Corlu A, Joffre A, Magloire H, Bonnaure-Mallet M. *Reconstituted human gingival epithelium: nonsubmerged in vitro model*. *In vitro cellular & Developmental Biology/Animal* 1997; 33: 30-36.

- Dessanti A**, Rigmonti W, Merulla V, Falchetti D, Caccia G. *Autologous buccal mucosa graft for hypospadias repair: an initial report*. Journal of Urology 1992; 147: 1081-1084.
- Donnersmark GH von**, Mühlbauer W, Höfter E, Hartinger A. *Die Verwendung von Keratinozytenkulturen in der Schwerbrandverletztenbehandlung – bisherige Erfahrungen, Ausblicke zur weiteren Entwicklung*. Der Unfallchirurg 1995; 98: 229-232.
- Duckett JW**, Coplen D, Ewalt D, Baskin LS. *Buccal mucosal urethral replacement*. Journal of Urology 1995; 153: 1660-1663.
- Erickson HP**. *Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X. a family of talented proteins in search of functions*. Current Opinions in Cell Biology 1993; 5: 869-876.
- Escurat M**, Landon F, Gumbel M, Portier MM. *Peripherin, an intermediate filament protein, is a developmental marker of specific neuronal populations*. In: Rousset BAF Structure and Function of the Cytoskeleton. London: Colloque Inserm/John Libbey Eurotext Ltd 1988; 169-179.
- Fichtner J**, Fisch M, Filipas D, Thüroff JW. *Refinements in buccal mucosal graft urethroplasty for hydospadias repair*. The World Journal of Urology 1998; 16: 192-194.
- Fichtner J**, Macedo A, Voges G, Fisch M, Filipas D, Hohenfellner R. *Buccal mucosa only for open urethral stricture repair – clinic and histology (abstract)*. Journal of Urology 1996; 155: 522.
- Filipas D**, Fisch M, Fichtner J, Fitzpatrick J, Berg K, Störkel S, Hohenfellner R, Thüroff JW. *The histology and immunohistochemistry of free buccal mucosa and full skin-grafts after exposure to urine*. The British Journal of Urology International 1999; 84: 108-111.
- Filipas D**, Wahlmann U, Hohenfellner R. *History of oral mucosa*. European Urology 1998; 34: 165-168.
- Frangos JA**, Hillsley MV. *Review: bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow*. Biotechnological Bioengineering 1996; 43: 573-581.
- Freeman MR**, Schneck FX, Klagsbrun M, Atala A. *Growth factor biology of human urothelial cells grown under serum-free conditions*. Journal of Urology 1995; 153: 4 (suppl).
- Furihata M**, Sonobe H, Ohtsuki Y. *The aberrant p53-protein (Review)*. International Journal of Oncology 1995; 6: 1209-1226.
- Fusenig NE**. *Culture of keratinocytes on collagen gels and use of transplantation chambers for grafting onto mouse skin*. Keratinocyte Methods (Leigh I and Watts F, eds), Cambridge University Press, London 1994; 57-61.
- Fusenig NE**. *Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth differentiation in vitro*. The Keratinocyte Handbook. Cambridge University Press, London 1994; 71-94.

- Fusenig NE**, Breitkreutz D, Dzarlieva RT, Boukamp O, Bohnert A, Tilgen A. *Growth and differentiation characteristics of transformed keratinocytes from mouse and skin in vitro and in vivo*. Journal of Investigative Dermatology 1983; 81: 165-168.
- Galvin S**, Loomis C, Manabe M, Dhouailly D, Sun TT. *The major pathways of keratinocyte differentiation as defined by keratin expression: an overview*. Adv. Dermatology 1989; 4: 277-300.
- George EL**, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes Ro. *Defects in mesoderm. Neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin*. Development 1993; 119: 1079-1091.
- Grant DS**, Tashiro K, Segui-Real B. *Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro*. Cell 1989; 58: 933-43.
- Greenblatt MS**, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer Research 1994; 54: 4855-4878.
- Haas TA**, Plow EF. *Integrin-ligand interactions: a year in review*. Current Opinions in Cell Biology 1994; 6: 671-678.
- Hayashi K**. PCR-SSCP: *A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA*. PCR Methods and Applications 1991; 1: 34-38.
- Hedren WH**, Atala A. *Use of bowel for vaginal reconstruction*. Journal of Urology 1994; 152: 752-755.
- Hedren WH**, Reda EF. *Bladder mucosa graft for construction of the male urethra*. Journal of Pediatric Surgery 1986; 21: 189-192.
- Hollstein M**, Sidranski B, Vogelstein B, Harris C. *P53 mutations in human cancers*. Science 1991; 253: 49-53.
- Hollstein M**, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. *Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines*. Updated compilation. Nucleic Acids Residues 1996; 24: 141-146.
- Hynes RO**. *Fibronectins*. Springer Series in Molecular Biology (Edited by Rich A) 1990; 1-538, New York.
- Iizuka K**, Muraishi O, Toshitaka M, Kitami Y, Xu YE, Watanabe K, Ogawa A. *Total replacement of urethral mucosa with oral mucosa in dogs*. Journal of Urology 1996; 156: 498-501.
- Izumi K**, Takacs G, Terashi H, Feinberg SE. *Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent*. Journal of Maxillofacial Surgery 1999; 57: 571-577.
- Junqueira**, Carneiro. *Histologie Springer Lehrbuch (3. Auflage) 1991, Berlin*.

- Kaufmann SH**, Mabry M, Jasti R, Shaper JH. *Differential expression of nuclear envelope laminins A and C in human lung cancer cell lines*. Cancer Research 1991; 51: 581-586.
- Kleihues P**, Kiessling M, Janzer RC. *Current topics in pathology: morphological tumor markers, general aspects, and diagnostic relevance*. In: Seifert G, ed. Morphological Markers in Neuro-Oncology. New York. Springer-Verlag New York, Inc; 1987; 307-308.
- Lane DP**. *P53: guardian of the genome*. Nature 1992; 358:15-16.
- Langer R**, Vacanti JP. *Tissue Engineering*. Science 1993; 260: 920-926.
- Lauer G**, Otten J-E, Schilli W. *Modifikationen in der Kultivierung von Gingivakeratinozyten*. Mund-, Kiefer- Gesichts-Chirurgie 1997; 1: 31-34.
- Lehman P**, Kloth S, Aigner J, Dammer R, Minuth, W. *Lebende Langzeitkultivierung von humaner Gingiva in der Perfusionskultur*. Mund-, Kiefer- Gesichts-Chirurgie 1997; 1: 26-30.
- Lendahl U**, Zimmerman LB, McKay RDG. *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell 1990; 60: 585-595.
- Limat A**, Breitzkreutz D, Hunziker T, Boillat C, Wiesmann U, Klein E, Noser F, Fusenig NE. *Restoration of the epidermal phenotype by follicular outer root sheath cells in recombinant culture with dermal fibroblasts*. Experimental Cell Research 1991; 194: 218-227.
- Limat A**, Stockhammer E, Breitzkreutz D, Schaffner T, Egelrud T, Salomon D, Fusenig NE, Braathen LR, Hunziker T. *Endogeneously regulated site-specific differentiation of human palmar skin keratinocytes in organotypic cocultures and in nude mouse transplants*. European Journal of Cell Biology 1996; 69: 245-258.
- Maas-Szwabowski N**, Fusenig NE. *Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts*. Journal of Investigative Dermatology 1996; 849-855.
- Maas-Szwabowski N**, Shimotoyodome A, Fusenig NE. *Keratinocyte growth regulation in fibroblast co-cultures via paracrine mechanism*. Journal of Cell Science 1999; 112: 1843-1853.
- Maas-Szwabowski N**, Stark HJ, Fusenig NE. *Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts*. Journal of Investigative Dermatology 2000; 114: 1075-1084.
- Makino R**, Yazyu H, Kishimoto Y, Sekiya T, Hayashi K. *F-SSCP: fluorescence-based polymerase chain-reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis*. PCR Methods and Applications 1992; 2: 10-13.
- Malizia AA**, Reiman HM, Myers RP, Sande JR, Barham SS, Benson RC, Dewanjee MK, Utz WJ. *Migration and granulomatous reaction after periurethral injection of*

Polytef (Teflon). The Journal of the American Medical Association 1984; 251: 3277-3281.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. 1982.

Meek DW, Simon S, Kikkawa U, Eckhart W. *The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II*. European Molecular Biology Organization Journal 1990; 9: 3252-3260.

Meyer AA, Manktelow A, Johnson M, Serres S de, Herzog S, Peterson HD. *Antibody response to xenogeneic proteins in burned patients receiving cultured keratinocytes grafts*. Trauma 1988; 28: 1054-1059.

Minchinton AI, Wendt KR, Clow KA, Fryer KH. *Multilayers of cells growing on a permeable support: an in vitro model*. Acta Oncologica 1997; 36: 13-16

Minuth WW, Aigner J, Kloth s, Steiner P, Tauc M, Jennings ML. *Culture of embryonic renal collecting duct epithelia in a gradient container*. Pediatric Nephrology 1997; 11: 140-147.

Moll R, Schiller DL, Franke WW. *Identification of Protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns*. Journal of Cell Biology 1990; 111: 567-580.

Moll R. *Epithelial tumor markers: cytokeratin and tissue polypeptide antigen (TPA)*. In Seifert G, ed. Morphological Tumor Markers. General aspects and diagnostics relevances. Springer Verlag New York 1987, 71-101.

Moll UM, Schramm LM. *P53- an acrobat in tumorigenesis*. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 1998; 9: 23-47.

Monfort G, Di-Benetto V, Meyrat B. *Urethral stenosis in children: treatment using urethroplasty with vesical or oral mucosal graft*. Annual Urology Paris 1993; 27: 237-242.

Mosher DF, Fogerty FJ, Chernousov MA et al. *Assembly of fibronectin into extracellular matrix. (Review)*. Annual New York Academy of Science 1991; 614: 167-180.

Muijen GNP van, Warner SD, Ponc M. *Differentiation related changes of cytokeratin expression in cultured keratinocytes and in foetal new born and adult epidermis*. Experimental Cell Research 1987; 171: 331-346.

Nelson WG, Kastan MB. *DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways*. Molecular Cell Biology 1994; 14: 1815-1823.

Nerem RM, Sambanis A. *Tissue Engineering: from biology to biological substitutes*. Tissue Engineering 1995; 1: 3-13.

- Odioso LL**, Doyle MJ, Quinn KW, Bartel RL, Zimmer MP, Stevens-Burns D. *Development and characterization of an in vitro gingival epithelial model*. Journal of Periodontal Research 1995; 30: 210-219.
- O'Donnell B**, Puri P. *Treatment of vesicoureteric reflux by endoscopic injection of Teflon*. The British Medical Journal 1984; 289: 7-9.
- O'Guin WM**, Galvin S, Schermer A, Sun TT. *Patterns of keratin expression define distinct pathways of epithelial development and differentiation*. Current Topics of Development Biology 1987; 22: 97-125.
- Olivia A**, Ragione FD, Riccio V, Tartaro G, Cozzolino A, Amato SD, Pontoni G, Zappia V. *Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts*. Biomaterials 1996; 17: 1351-1356.
- Politano VA**. *Periurethral polytetrafluoroethylene injection for urinary incontinence*. Journal of Urology 1982; 127: 439-442.
- Puelacher WC**, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP; Vacanti CA. *Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers chondrocytes*. Biomaterials 1994; 15: 774-778.
- Rennekampf HO**, Kiessig V, Hansbrough JF. *Current concepts in the development of cultured skin replacements*. Journal of Surgery Residues 1996; 62: 288-295.
- Retik B**, Bauer SB, Mandell J, Peters CA, Colodny A, Atala A. *Management of severe hypospadias with 2-stage repair*. Journal of Urology 1994; 152: 749-751.
- Rober RA**, Sauter H, Weber K, Osborn M. *Differential timing of nuclear laminin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study*. Development 1989; 105: 365-378.
- Romberger DJ**. *Fibronectins*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 1997; 29: 939-943.
- Sakamoto T**, Hinton DR, sakamoto H, Oganessian A, Kohen L, Gopalakrishna R, Ryan SJ. *Collagen gel contraction induced by retinal pigment epithelial cells and choroidal fibroblasts involves the protein kinase C pathway*. Current Eye Research 1994; 13: 451-459.
- Sage EH**, Bornstein P. *Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SARC, tenascin and thrombospondin*. Journal of Biological Chemistry 1991; 266: 14831-14834.
- Sang N, Baldi A, Giordano A**. *The roles of tumour suppressors pRb and p53 in cell proliferation and cancer*. Molecular and Cellular Differentiation 1995; 3: 1-29.
- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-termination inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Science USA 1977; 74: 5463-5467.

- Shinohara M**, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara SI, Shirasuna K, Garrod DR. *Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour.* Journal of Pathology 1998; 184: 369-381.
- Sittinger M**, Buija Jrotter J, Reitzel N, Minuth WW, Burmester GR. *Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques.* Biomaterials 1996a; 17: 237-242.
- Sittinger M**, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Kastenbauer E, Hammer C, Planck H, Burmester GR, Buija J. *Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes.* Journal of Biomedicine and Material Research 1996b; 33: 57-62.
- Sittinger M**, Schutz O, Keyszer G, Minuth WW, Burmeister GR. *Artificial tissues in perfusion culture.* The Journal of Artificial Organs 1997; 20: 55-62.
- Sjögren S**, Inganäs M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L, Bergh J. *The p53 gene in breast cancer: Prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry.* Journal of the National Cancer Institute 1996; 88: 173-182.
- Stark HJ**, Baur M, Breitzkreuz D, Mirancea N, Fusenig NE. *Organotypic keratinocytes cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation.* Journal of Investigative Dermatology 1999; 112: 681-691.
- Steinert PM**, Liem K. *Intermediate filament dynamics.* Cell 1990; 23: 521-523.
- Sternberger LA**, Sternberger NA. *Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and dephosphorylated forms of neurofilaments in situ.* Procedure Natural Academy of Science USA 1983; 80: 6126-6130.
- Sugano K**, Nakashima Y, Yamaguchi K, Fukayama N, Maekawa M, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. *Sensitive detection of loss of heterozygosity in the TP53 gene in pancreatic adenocarcinoma by fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis using blunt-end DNA-fragments.* Genes, Chromosomes & Cancer 1996; 15: 157-164.
- Sumi Y**, Muramatsu H, Hata K, Ueda M, Muramatsu T. *Secretory leukocyte protease inhibitor is a novel inhibitor of fibroblast-mediated collagen gel contraction.* Experimental Cell Research 2000; 256: 203-212.
- Szumiel I.** *Ionizing radiation-induced cell death* (Review). International Journal of Radiology 1994; 66:329-341.
- Tachibana M**, Nagamatsu GR, Addonizio JC. *Ureteral replacement using collagen sponge tube grafts.* Journal of Urology 1985; 133: 866-869.
- Thorup AK**, Dabelsteen E, Schou S, Gil SG, Carter WG, Reibel J. *Differential expression of integrins and laminin-5 in normal oral epithelia.* Acta Pathologica, Mikrobiologica et Immunologica Scandinavica 1997; 105: 519-530.

- Thüroff JW**, Bazeed MA, Schmidt RA, Luu DJ, Tanagho EA. *Cultured rabbit vesical smooth muscle cells for lining of dissolvable synthetic prosthesis*. Urology 1983; 21: 155-158.
- Tobin MS**, Freeman MR, Atala a. *Maturation response of normal human urothelial cells in culture is dependent on extracellular matrix and serum additives*. Surgical Forum 1994; 45: 786.
- Tomakidi P**, Fusenig NE, Kohl A, Komposch G. *Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells*. Journal of Periodontal Research 1997; 32: 388-400.
- Tomakidi P**, Breitkreutz D, Fusenig NE, Zöller J, Kohl A, Kompsch G. *Establishment of oral mucosa phenotype in vitro in correlation to epithelial anchorage*. Cell and Tissue Research 1998; 292: 3555-366.
- Tomakidi P**, Breitkreutz D, Kohl A, Komposch G. *Normalization of keratinocyte-type integrins during the establishment of the oral mucosa phenotype in vitro*. Annals of Anatomy 1999; 181: 127-132.
- Wang Y**, Prives C. *Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases*. Nature 1995; 376: 88-91.
- Wilson WR**, Hicks KO, Fleming Y, Siim BG, Koch CJ. *Extravascular diffusion of tirapazamine: effect of metabolic assessed using a multicellular layer model*. International Journal of Radiology-Oncology-Biology-Physiology 1998; 42: 641-649.
- Wilson WR**, Hicks KO, Ohms SJ van Zijl PL, Denny WA, Hunter PJ. *An experimental and mathematical model for the extravascular transport of DNA intercalator in tumours*. The British Journal of Cancer 1997 76: 894-903.
- Yamamoto T**, Hartmann K, Eckes B, Krieg T. *Mast cells enhance contraction of three-dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell-cell interaction: role of stem cell factor/c-kit*. Immunology 2000; 99: 435-439.
- Yonish-Rouach**. *The p53 tumour suppressor gene: a mediator of G₁ growth arrest and of apoptosis*. Experientia 1996; 52: 1001-1007.
- Yonish-Rouach**. *A question of life or death: the p53 tumour suppressor gene*. Pathological Biology 1997; 45: 815-823.
- Yurchenco PD**, O'Rear JJ. *Basal lamina assembly* (Review). Current Opinion of Cell Biology 1994; 6: 674-681.
- Zambetti GP**, Levine AJ. *A comparison of the biological activities of wild-type and mutant P53*. Federation of American Societies of Experimental Biology 1993; 7: 855-865.

7 Anhang

7.1 Tumorsuppressorgen p53

7.1.1 cDNA-Sequenz von p53

<u>G</u> TCTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGGCTCCGGGGACACTTTGCGTTCC	60
GGCTGGGAGCGTGCTTTCCACGACGGT GACACGCTTCCCTGGATTGGC AGCCAGACTGCC	120
TTCCGGGTCACTGCC <u>ATG</u> GAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGT	180
CAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAAACT <u>A</u> CTTCCTGAAAACAACGTTCTG <u>T</u> CCCCCTTG	240
CCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACT	300
GAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCCT	360
GCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCT	420
TCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACG GTTTCCGCTCTGGGCTTCTTGCA T	480
TCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGACAG <u>T</u> ACTCCCCT GGCCTCAACAAGATGTTTTGC	540
CAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCGGCACC	600
CGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGC	660
TGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG <u>G</u> TCT TGGCCCTCCTCAGCATCTT ATC	720
CGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGT	780
GTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCT GAGGTTGGCTCTGACTGTACC ACCATCCACTACAAC	840
TACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATC	900
ACACTGGAAGACTCCAG <u>T</u> GGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTGT	960
GCCTGTCTGGGAGAGAC CGGCGCACAGAGGAAGAGAAT CTCCGCAAGAAAGGGGAGCCT	1020
CCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCCTCAG <u>A</u> TCCGTGGGCGT	1140
GAGCGCTTCGAGATGTTCC GAGAGCTGAATGAGGCCTT GGAACCAAGGATGCCCAGGCT	1200
GGGAAGGAGCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAG <u>C</u> CACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAG	1260
TCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGAC <u>TGA</u> CAT	1320
TTGGGTTTTGGGTCTTTGAAC CCCTTGCTTGCAATAGGTGTGCGTC •••	1423

Abb. 56: Nukleotidsequenz der cDNA von Tumorsuppressorgen p53: die verwendeten Primer sind farbig dargestellt (rot: Forward, grün: Reverse), Fettdruck und Unterstreichen markieren den Beginn eines Exons; die beiden Rahmen lokalisieren das Start- (ATG) bzw. das Stopcodon (TGA).

7.1.2 Charakterisierung der Exons von p53

Tabelle 20: Charakterisierung der Exons von p53 unter Berücksichtigung der Proteinbiosynthese

Exon	Lokalisation auf der cDNA	Größe [Bp]	Proteinbiosynthese
1	1-107	106	
2	108-209	101	1-24
3	210-231	21	25-32
4	232-510	278	33-125
5	511-694	183	126-186
6	695-807	112	187-224
7	808-917	109	225-260
8	918-1054	136	261-306
9	1055-1128	73	307-331
10	1129-1235	106	332-366
11	1236-2513	1277	367-393

7.1.3 Proteinsequenz von p53

MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP 60
 DEAPRMPEAAPRVAPGPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLLGFLHSGTAK 120
 SVTCTYSPALNKMFCQLAKTQCPVQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQHMTEVVRCPHHE 180
 RCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS 240
 SCMGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEV^RVCACPGRDR^RRTEENLRKKGEPHHELP 300
 PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPG 360
 GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS 393

Abb. 57: Proteinsequenz von p53, wobei die Aminosäuren mit den häufigsten Mutationsraten („Hotspots“) rot dargestellt sind. Es handelt sich um R₁₇₅, G₂₄₅, R₂₄₈, R₂₄₉, R₂₇₃ und R₂₈₂.

7.2 Chemikalien

Aceton	Fa. Roth	Karlsruhe
Adenin	Fa. Sigma	Deisenhofen
Agarose (zur DNA/RNA-Elektrophorese)	Fa. Roth	Karlsruhe
Aktivkohle	Fa. Merck	Darmstadt
Borsäure krist.	Fa. Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Fa. Merck	Darmstadt
Choleratoxin	Fa. Sigma	Deisenhofen
Cosmic Calf (CC) Hyclone	Fa. Greiner	Frickhausen
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Fa. Roth	Karlsruhe
1,4-Diazabicyclo(2,2,2)-octan (DABCO)	Fa. Fluka	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma	Deisenhofen
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Fa. Sigma	Deisenhofen
Epithelialer Wachstumsfaktor (EGF)	Fa. Sigma	Deisenhofen
Essigsäure p.a.	Fa. Roth	Karlsruhe
Ethanol p.a.	Fa. Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fa. Sigma	Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fa. Sigma	Deisenhofen
Fuchsin	Fa. Merck	Darmstadt
HANK's Salze	Fa. Seromed	Berlin
Hydrocortison	Fa. Sigma	Deisenhofen
Insulin	Fa. Sigma	Deisenhofen
Kaliumchlorid	Fa. Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck	Darmstadt
Kaliumdisulfit	Fa. Merck	Darmstadt

β-Mercaptoethanol	Fa. Sigma	Deisenhofen
Natriumbisulfit (39%)	Fa. Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Fa. Merck	Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Fa. Merck	Darmstadt
Natriumhydroxidplättchen	Fa. Roth	Karlsruhe
Natriummetaperiodat	Fa. Merck	Darmstadt
Orange G	Fa. Merck	Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Fa. Sigma	Deisenhofen
2-Propanol (Isopropanol) p.a.	Fa. Roth	Karlsruhe
Saccharose	Fa. Sigma	Deisenhofen
Salpetersäure (40%)	Fa. Merck	Darmstadt
Salzsäure 37% p.a.	Fa. Merck	Darmstadt
SCHIFF'sches Reagenz	Fa. Merck	Darmstadt
Tris(hydroxymethylaminomethan)	Fa. Roth	Karlsruhe
Tissue Tek	Fa. Vogel	
Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%)	Fa. Sigma	Deisenhofen
Xylol	Fa. Sigma	Deisenhofen

7.3 Puffer und Lösungen

Adenin-Lösung (FAD _{komplett})	1,215 g Adenin in 50 ml 0,2 M HCl lösen (50°C) 1 vial = 1 ml
Alkohole (Histologie)	70%, 80%, 96%, 100%
Auftragspuffer für Agarosegele (6x)	0,25 % Bromphenolblau 40% (w/v) Saccharose in TBE-Puffer (0,5x) lösen
Choleratoxin-Stammlösung (FAD _{komplett})	0,5 mg Choleratoxin in 595 µl Aqua dest. lösen
Choleratoxin-Lösung (FAD _{komplett})	0,1 ml Stammlösung In 10 ml FAD mit 10% (v/v) CC lösen 1 vial = 1 ml
DABCO (IIF)	10% (w/v) 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)-octan 10% (w/v) PBS-Puffer (1x) in Glycerol
DAPI (IIF)	1,0 mg/ml 4'6-Diamino-2-phenylindol in TE-Puffer pH = 8,0
DEPC-Wasser (RNA-Extraktion)	0,1% (v/v) DEPC in Aqua dest. 18 h bei 37°C inkubieren, autoklavieren
Differenzierlösung (Histologie)	5 ml 10% (v/v) Natriummetabisulfit 5 ml 1N HCl 100 ml Aqua dest
EDTA-Stammlösung	0,5 M EDTA

EGF-Lösung (FAD _{komplett})	100 µg Epithelialer Wachstumsfaktor in 10 ml Aqua dest. lösen 1 vial = 1 ml
Eosin-Lösung (Histologie)	1% (w/v)
HCl-Lösungen	5 M, 1M, 0.2 M
Hydrocortisonlösung (FAD _{komplett})	1,0 mg Hydrocortison in 200 µl 100 % Ethanol lösen 2,3 ml Aqua dest. zugeben 1 vial = 1 ml
Insulin-Lösung (FAD _{komplett})	120 mg Insulin in 40 ml FAD lösen unter Zugabe von 5 M HCl 1 vial = 1.7 ml
Natriumchlorid	1 M, 3 M
Natriummetabisulfit	10% (v/v)
Natronlauge	1N, 5 M
Orange G (Histologie)	1% (w/v) 5%ige Phosphorwolframsäure
PBS-Puffer (10x)	1,37 M NaCl 26,7 mM KCl 43 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 15 mM KH ₂ PO ₄ xH ₂ O
PBS (1x)	1,5 M NaCl 160 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O

Perjodsäure (Histologie)	1,0 g Natriumperjodat 1 ml 40% HNO ₃ 100 ml Aqua dest.
Phosphorwolframsäure (Histologie)	5% (w/v)
PCR-Nukleotidmix (RT, PCR)	ATP, GTP, CTP, TTP
Salpetersäure	40% (v/v)
TBE-Elektrophoresepuffer (10x)	0,5 M Tris 0,5 M Borsäure 10 mM EDTA pH = 8,0 (HCl)
TBE-Elektrophoresepuffer (0.5x)	0,025 M Tris 0,025 M Borsäure 0,001 M EDTA pH = 8,0 (HCl)
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH = 7,5 (HCl)
Tris-Cl-Stammlösungen	1M pH = 7,5/8,0 (HCl)

Anm.: 1 vial bezeichnet die Lösungs- oder Substratmenge, die zum Komplettieren von einem Liter Keratinozytennährlösung dem Basismedium zugesetzt werden muß.

7.4 Nährmedien

DULBECCO's Modification Eagle's Medium (DMEM, Fa. Sigma, Deisenhofen)

4,5 g/l L-Glukose

110 mg/l L-Glutamin

110 g/l Natriumpyruvat

DULBECCO's MEM (DMEM*, Fa. Biochrom, Berlin)

4,5 g/l L-Glukose

1,028 g/l L-Glutamin

3,7 g/l NaCO₃

DMEM/HAM's F-12-Medium (Fa. Biochrom, Berlin)

0,648 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin

FAD_{komplett}-Medium

666ml DMEM*

333ml DMEM/HAM's-F12

10% (v/v) Cosmic Calf

100 IU/ml Penicillin/Streptomycin

1 vial Adenin-Lösung

1 vial Choleratoxin-Lösung

1 vial EGF-Lösung

1 vial Hydrocortison-Lösung

1 vial Insulin

7.5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Anm.	Anmerkung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adeninriphosphat
BM	Basalmembran
Bp	Basenpaare
CC	Cosmic Calf
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Cytokeratin
Coll IV	Collagen IV
CTP	Cytosinriphosphat
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)-octan
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DG	Desmoglein
DMEM	DULBECCO's Modification Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidriphosphate
DP	Desmoplakin
ds	doppelsträngig
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FP	Forward-Primer
FCS	fötales Kalberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
GTP	Guanosinriphosphat

IF	Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IP	Isoelektrischer Punkt
IU	Internationale Einheit (Unit)
kBp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
krist.	kristallin
µl	Mikroliter
µm	mikrometer
ml	Milliliter
mM	Millimolar
N	Normal
nm	Nanometer
p.a.	per Analyse
PAS	Periodic
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RP	Reverse-Primer
RNA	Ribpnukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
ss	einzelsträngig
SSCP	Single strand Conformation Polymorphism
TTP	Thymidintriphosphat
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent