

# **Differenzierungsverhalten immortalisierter humaner gingivaler Keratinozyten**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von  
**Henning Schaumburg**  
aus Wuppertal

Gießen 2017

Aus dem Medizinischem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Poliklinik für Parodontologie  
Direktor Prof. Dr. J. Meyle  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Meyle
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Domann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 06. 2017

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Morphologie und Aufbau der Mundschleimhaut</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Keratine</b>	<b>3</b>
3.1	Vorkommen und Klassifizierung . . . . .	3
3.2	Biochemischer Aufbau . . . . .	7
3.3	Keratine als Bestandteile des intrazellulären Netzwerks . . . . .	9
<b>4</b>	<b>Terminale Differenzierung der Keratinozyten</b>	<b>11</b>
4.1	Begriffsklärung . . . . .	11
4.2	Zusammenhang zwischen Apoptose und terminaler Differenzierung . . . . .	17
4.3	Gemeinsamkeiten und Unterschiede epidermaler und oraler Keratinozyten . . . . .	18
4.4	Expressionsmuster ausgewählter Differenzierungsmarker . . . . .	19
<b>5</b>	<b>Fragestellung und Hypothese</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
6.1	Material . . . . .	22
6.1.1	Medien, Lösungen und Puffer . . . . .	22
6.2	Methoden . . . . .	23
6.2.1	Zelllinien . . . . .	23
6.2.2	Zellkultivierung und Zelldifferenzierung in Zellkulturflaschen . . . . .	24
6.2.3	Zellfixierung aus Zellkulturflaschen . . . . .	24
6.2.4	Zellkultivierung und Zelldifferenzierung auf Zellkultureinsätzen . . . . .	25
6.2.5	Zellfixierung von Zellkultureinsätzen . . . . .	26
6.2.6	Durchflusszytometrie . . . . .	26
6.2.7	Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse . . . . .	28

## *Inhaltsverzeichnis*

---

6.2.8	Messung und Berechnung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) . . . . .	32
<b>7</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
7.1	Aussaat in Zellkulturflaschen . . . . .	33
7.1.1	Analyse immortalisierter humaner gingivaler Keratinozyten (IHGK) im Durchflusszytometer . . . . .	33
7.1.2	Analyse primärer humaner gingivaler Keratinozyten (PHGK) im Durchflusszytometer . . . . .	43
7.1.3	Graphische Darstellung der Ergebnisse der IHGK und PHGK . . . . .	53
7.2	Aussaat auf Zellkultureinsätzen . . . . .	58
7.2.1	Analyse immortalisierter humaner gingivaler Keratinozyten (IHGK) im Durchflusszytometer . . . . .	58
7.2.2	TER-Berechnung . . . . .	63
<b>8</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
8.1	Aussaat in Zellkulturflaschen . . . . .	64
8.2	Aussaat auf Zellkultureinsätzen . . . . .	71
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Summary</b>	<b>75</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>12</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>13</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>14</b>	<b>Anhang</b>	<b>98</b>
14.1	Verbrauchsmaterialien . . . . .	98
14.2	Antikörper für Immunfärbung . . . . .	100

*Inhaltsverzeichnis*

---

14.3 Apparate und Instrumente . . . . .	101
<b>15 Erklärung</b>	<b>102</b>
<b>16 Curriculum Vitae</b>	<b>103</b>

### 1 Einleitung

Die vierte deutsche Mundgesundheitsstudie aus dem Jahre 2005 zeigt die zunehmende Bedeutung parodontaler Erkrankungen im zahnärztlichen Behandlungsspektrum. Unter den Erwachsenen leiden 52,7 Prozent unter mittelschweren und 20,5 Prozent unter schweren Formen der Parodontitis. Dies ist eine deutliche Zunahme im Vergleich zur dritten Mundgesundheitsstudie aus dem Jahre 1997 (Micheelis und Schiffner 2006). Nahezu alle entzündlichen Erkrankungen des Parodonts sind mit einer bakteriellen Infektion parodontaler Gewebe und entsprechender Immunreaktion der Wirtsabwehr assoziiert. Dabei hat die Gingiva in Verbindung mit dem Saumepithel und dem darunterliegendem Bindegewebe eine besondere Bedeutung, da sie die erste Barriere ist, die die Erreger überwinden müssen. Erst dann kann es zu einer etablierten Gingivitis mit Ausbildung einer gingivalen Tasche und im fortgeschrittenen Stadium zur Zerstörung des Attachments kommen (Löe et al. 1965; Page 1986). Die komplexen Zusammenhänge zwischen Mikroorganismen, Immunantwort des Wirtes, Bindegewebs- und Knochenmetabolismus sowie genetischen und Umweltfaktoren (Page und Kornman 1997) erschweren es die Bedeutung und den Einfluss einzelner Komponenten dieser multifaktoriellen Erkrankung *in vivo* zu untersuchen. Daher ist man auf *in vitro* Untersuchungen angewiesen um zu verstehen, wie es Bakterien gelingt, die epitheliale Barriere zu durchbrechen. Gröger et al. haben ein Zellkulturmodell zur *in vitro* Analyse beschrieben, anhand dessen der Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* auf gingivale Keratinozyten untersucht wurde (Gröger et al. 2010).

Ziel der vorliegenden Studie ist es gingivale Keratinozyten *in vitro* auf ihr Differenzierungsverhalten zu untersuchen und damit das *in vitro* Zellkulturmodell zu charakterisieren.

## 2 Morphologie und Aufbau der Mundschleimhaut

Die Schleimhäute der Mundhöhle gliedern sich in auskleidende, mastikatorische und spezialisierte Mukosa, die sich, je nach Lage und Funktion, deutlich voneinander unterscheiden.

Auskleidende Mukosa befindet sich in allen unverhornten Schleimhautbereichen der Mundhöhle, wie der Wange, den Lippen, dem Alveolarkamm unterhalb der mukogingivalen Grenze, dem weichen Gaumen und dem Mundboden. Gemeinsam ist diesen Schleimhäuten ihre epitheliale Schichtung in Stratum basale, Stratum filamentosum und Stratum distendum. Ein Stratum corneum fehlt. Das Epithel ist dehnbar und das darunterliegende Bindegewebe elastisch und fest mit der muskulären oder knöchernen Grundlage verwachsen. Ausnahme bildet hier die Schleimhaut des Mundbodens, die auf Grund der Beweglichkeit der Zunge nur lose mit der Mundbodenmuskulatur verbunden ist. Diese Strukturen verleihen der auskleidenden Mukosa eine hohe Flexibilität, um die Beweglichkeit der ihr unterliegenden Gewebe nicht einzuschränken. Die Dicke des Epithels (0,1 - 0,5 mm), die Dichte der Bindegewebspapillen (15 - 75 Papillen/mm<sup>2</sup>) und die Menge an elastischen Fasern im Bindegewebe ist abhängig von der lokalen mechanischen Belastung.

Die verhornten Schleimhäute des harten Gaumens und der Gingiva sind Bestandteile der mastikatorischen Mukosa. Ihre epitheliale Schichtung gliedert sich in Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum. Das Epithel bildet eine Diffusionsbarriere für wasserlösliche Substanzen. Die Reteleisten sind äußerst stark ausgebildet und bilden eine intensive Verzahnung von Epithel und Lamina propria. Das Bindegewebe enthält kollagene Fasern und ist fest mit dem Periost des darunter liegenden Knochens verbunden. Strukturell ist die mastikatorische Mukosa dafür ausgelegt trotz der mechanischen Belastung beim Kauen ihre Integrität zu erhalten. Die spezialisierte Mukosa des Zungenrückens ist oberflächlich durch die Aufwerfungen des Epithels und der oberen Schicht der Lamina propria, den Papillen, geprägt. Das Epithel ist mehrschichtig und weist verhornte und unverhornte Bereiche auf. Die Ausbildung von Geschmacksknospen und Nervenendigungen ermöglicht Tast-, Geschmacks- und Temperaturempfindungen. Das Epithel ist über das Bindegewebe fest und damit unverschieblich mit der Zungenmuskulatur verbunden (Schröder 1981, 2000).

Die Basalmembran ist Grenzfläche und Verbindungsstruktur zwischen Epithel und Bindegewebe. Die sie aufbauenden Bestandteile sind in allen oralen Schleimhäuten gleich. Die mit Mikrovilli besetzte Basalfläche der Zellen des Stratum basale enthält Hemidesmosomen, die über Ankerfilamente an die Basallamina geheftet sind. Die Basallamina besteht aus homogenen Netzwerken des Kollagen IV und Laminin 1, die über Nidogenbrücken miteinander verbunden sind. Kollagen VII haftet an Kollagen IV der Basallamina und an Ankerplaques in der Lamina propria unter Ausbildung schlaufenartiger Strukturen, in die sich kollagene Fasern des Bindegewebes einlagern (Garant 2003).

Im Schleimhautepithel treten neben den Keratinozyten auch freie Zellen auf, die nicht mit Desmosomen in den Zellverband integriert sind. Eine Ausnahme machen die Merkelzellen, die einzelne Kontakte ausbilden können. Melanozyten haben lange dendritische Fortsätze, über die sie das von ihnen produzierte Melanin in Keratinozyten injizieren. Melanozyten kommen wie Merkelzellen im Stratum basale vor. Merkelzellen enthalten membranumschlossene Vesikel in denen sich Transmitter befinden. Werden diese nahe einer Nervenfaser ausgeschüttet, verstärkt dies den Nervenimpuls. Sie werden als drucksensible Zellen angesehen. Die aus dem Knochenmark stammenden Langerhans Zellen befinden sich im Stratum suprabasale. Sie verarbeiten und präsentieren Antigene, die von außen das Epithel durchdringen. Des Weiteren sind Abwehrzellen Bestandteile der unverhornten Zellschichten oraler Epithelien. Neben polymorphkernigen Leukozyten und Mastzellen bilden die Lymphozyten die größte Gruppe (Squier und Kremer 2001).

## **3 Keratine**

### **3.1 Vorkommen und Klassifizierung**

Keratine sind Teil der großen Gruppe der Intermediärfilamente (IF), die neben Mikrotubuli und Aktinfilamenten zum Zytoskelett gehören. Ihr Durchmesser von 10-12 nm liegt zwischen dem der Mikrotubuli (25nm) und dem der Aktinfilamente (7nm) (Lüllmann-Rauch 2003), was zu ihrer Bezeichnung führte. Neben den sauren Keratinen (Typ I) und den neutral-basischen Keratinen (Typ



### 3 Keratine

---

Tabelle 1: Vorkommen der IF-Typen in Geweben (Szeverenyi et al. 2008)

Intermediärfilament		Vorkommen
Typ I	saure Keratine	Haut, Haar, Hornsubstanz
Typ II	neutral-basische Keratine	Haut, Haar, Hornsubstanz
Typ III	Vimentin	Zellen mesenchymaler Herkunft
	Desmin	Muskelzellen
	Gliafilamente aus GFAP	Astrogliazellen, Schwannzellen
Typ IV	Neurofilamente	Nervenzellen
Typ V	Laminfilamente	Zellkern
Typ VI	Phakinin, Filensin	Augenlinse

II), gehören zu den IF auch Vimentin, Desmin und die Gliafilamente (Typ III), die Neurofilamente (Typ IV) und die Laminfilamente (Typ V) (Strelkov et al. 2003; Coulombe und Wong 2004). Phakinin und Filensin bilden eine sechste Gruppe (Typ VI), die auch zu den IF gezählt wird, obgleich es strukturelle Unterschiede zu den anderen Typen gibt (Georgatos et al. 1997). Bis auf die Laminfilamente, die im Nucleus lokalisiert sind, sind alle Intermediärfilamente Bestandteile des Zytoplasma (Herrmann und Aebi 2004).

Beim Menschen spielen Keratine eine wichtige Rolle in den Epithelien und den Hautanhangsgebilden Nagel und Haar (Lynch et al. 1986). Je nach Epitheltyp und Lage der Zellschicht unterscheidet sich die Keratinexpression der Zelle. Marker für einfache Epithelien sind z. B. K8/K18, die zudem die phylogenetisch ältesten und embryonal zuerst auftretenden Keratine sind. Andere prominente Keratine sind in mehrschichtigen Epithelien K5/K14 im Stratum basale und K1/K10 im Stratum spinosum (Fuchs 1995). Neben den epithelialen Keratinen gibt es die Haar-Keratine (auch harte oder  $\alpha$ -Keratine genannt), die das Haar und den Nagel bilden aber auch im Thymus und im Epithel der Zunge zu finden sind (de Berker et al. 2000). Die Gene der Keratine sind auf zwei Cluster aufgeteilt, denen jeweils 27 funktionelle Gene angehören. Auf Chromosom 17q21.2 befinden sich alle Gene der Keratine Typ I, auf Chromosom 12q13.13 alle Gene für die Keratine Typ II. Einzige Ausnahme ist saure K18, das in der Domäne der basischen Typ II Keratine lokalisiert ist (Rogers et al. 2005, 2004).

### 3 Keratine

---

Eine neue Nomenklatur wurde 2006 entwickelt, die auf der alten Gliederung beruht. Dies wurde notwendig, da neue Keratine entdeckt wurden und durch eine genetische Analyse schon bekannte Keratine neu klassifiziert werden mussten. So erwies sich beispielsweise Keratin 11 als Polymorphismus des Keratin 10 (Korge et al. 1992; Mischke 1998).

Tabelle 2: Neue Nomenklatur der Keratine (Schweizer et al. 2006)

Kategorie	Nummerierung der Keratine
Menschliche epitheliale Keratine Typ I	9-28
Menschliche harte Keratine Typ I	31-40
Nichtmenschliche epitheliale und harte Keratine Typ I	41-70
Menschliche epitheliale Keratine Typ II	1-8 und 71-80
Menschliche harte Keratine Typ II	81-86
Nichtmenschliche epitheliale und harte Keratine Typ II	87-120
Pseudogene Typ I	121-220
Pseudogene Typ II	ab 221

Für die menschlichen epithelialen Keratine gilt die Gliederung nach Tabelle 3.

Tabelle 3: menschliche epitheliale Keratine (Schweizer et al. 2006)

Typ I		Typ II	
alte Bezeichnung	neue Bezeichnung	alte Bezeichnung	neue Bezeichnung
K9	K9	K1	K1
K10	K10	K2e	K2
K12	K12	K3	K3
K13	K13	K4	K4
K14	K14	K5	K5

### 3 Keratine

K15	K15	K6a	K6a
K16	K16	K6b	K6b
K17	K17	K6e/h	K6c
K18	K18	K7	K7
K19	K19	K8	K8
K20	K20	K6irs1	K71
K21 rat	-	K6irs2	K72
K23	K23	K6irs3	K73
K24	K24	K6irs4	K74
K25irs1, K10C, hIRSa1	K25	K6hf	K75
K25irs2, K10D	K26	K2p	K76
K25irs3, K10B, hIRSa3.1	K27	K1b	K77
K25irs4, hIRSa2	K28	K5b	K78
		K6l	K79
		Kb20	K80

Keratine haben entscheidenden Einfluss auf die Integrität der Zellen und Zellverbände. Dies zeigt sich bei Hautkrankheiten wie Epidermolysis bullosa simplex (EBS) oder bullöser kongenitaler ichthyosiformer Erythrodermie (BCIE) bei denen Mutationen der Keratine K5/K14 (EBS) und K1/K10 (BCIE) die Ursache einer gestörten Keratin-Bildung und Zusammensetzung sind. Je nach Krankheitstyp kommt es in der basalen (EBS) oder suprabasalen (BCIE) Zellschicht der Haut zum Verlust des zellulären Zusammenhalts und damit zu Blasenbildung und einer verminderten Belastbarkeit durch mechanische Traumen (Irvine und McLean 1999). Versuche mit knockout Mäusen haben gezeigt, dass Keratine eine gewisse funktionelle Redundanz besitzen und somit das Fehlen einer genetischen Information durch Expression ähnlicher Keratine kompensiert werden kann. Phänotypisch äußert sich dies in einer Abschwächung des Krankheitsbildes (Coulombe und Omary 2002). Auf nicht-mechanischen Stress, z. B. durch toxische Substanzen reagiert die Zelle mit einem Anstieg der zytoplasmatischen Keratinkonzentration, die eine erhöhte toxische Belastbarkeit der Zelle

zur Folge hat (Zatloukal et al. 2004). Des Weiteren beeinflusst die Expression des Keratinnetzwerkes die Form und Viskoelastizität der Zelle. Dies hat großen Einfluss bei der Zellmigration an Wundrändern oder der Metastasierung von Krebszellen durch Basalmembranen und Endothelien (Beil et al. 2003). Auch Vorgänge der Zelldifferenzierung, des Zellzyklus und der Apoptose können durch die zytoplasmatische Keratinzusammensetzung beeinflusst werden (Coulombe und Wong 2004).

### 3.2 Biochemischer Aufbau

Typisch für die keratinen Intermediärfilamente ist ein heterogenes Dimer, das sich aus einem Protein der sauren (Typ I) und der neutral-basischen (Typ II) Keratine zusammensetzt (Steinert 1990). Jede Aminosäurekette hat eine zentrale Sequenz von etwa 310 Resten, die eine  $\alpha$ -Helix ausbildet (Irvine und McLean 1999). Ein Heptadenrepeat (abcdefg)<sub>n</sub> in der Aminosäureabfolge, bei der auf den Positionen a und d auffällig häufig apolare Seitenketten sind, ermöglicht die Zusammenlagerung der  $\alpha$ -Helices zu einer coiled-coil Struktur (Superhelix) (Parry und Steinert 1992). Jene Seitenketten bilden auf der Oberfläche der rechtsgängigen  $\alpha$ -Helix einen linksgängigen apolaren Streifen, da durch die Zusammenlagerung der  $\alpha$ -Helices ihre Achsen leicht gebogen werden, wodurch auf eine Drehung ( $360^\circ$ ) nur noch 3,5 und nicht 3,6 Aminosäuren fallen (Cohen und Parry 1990). So verschiebt sich der apolare Streifen pro Windung um 0,1 Aminosäuren. Dieser apolare Streifen bildet die Nahtstelle an der sich die  $\alpha$ -Helices durch hydrophobe Wechselwirkungen aneinander lagern und die Superhelix stabilisieren (Parry und Steinert 1992).

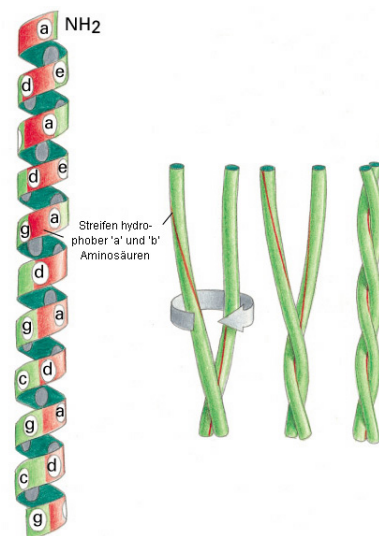


Abbildung 1: Sekundärstruktur der  $\alpha$ -Helix (Alberts et al. 2002)

leicht gebogen werden, wodurch auf eine Drehung ( $360^\circ$ ) nur noch 3,5 und nicht 3,6 Aminosäuren fallen (Cohen und Parry 1990). So verschiebt sich der apolare Streifen pro Windung um 0,1 Aminosäuren. Dieser apolare Streifen bildet die Nahtstelle an der sich die  $\alpha$ -Helices durch hydrophobe Wechselwirkungen aneinander lagern und die Superhelix stabilisieren (Parry und Steinert 1992).

Die aus den beiden heterogenen Keratinen gebildete coiled-coil Struktur wird von drei nichtheleichen Linkern (L1, L12, L2) in vier Subdomänen (1A, 1B, 2A, 2B) unterteilt und wird am Amino-Terminus von einer Kopf- und am Carboxyl-Terminus von einer Schwanzdomäne begrenzt, die bei den epithelialen Keratinen wiederum in eine homologe (H1, H2), eine variable (V1, V2) und eine

### 3 Keratine

Enddomäne (E1, E2) gegliedert werden. H1, V1, E1 befinden sich auf der Kopfdomäne; H2, V2, E2 auf der Schwanzdomäne (Parry und North 1998; Rugg und Leigh 2004). Der aus der Superhelix aufgebaute Zylinder ist hoch konservativ, d. h. zu einem hohen Anteil in den verschiedenen Intermediärfilamenten vorhanden. Zwei besonders hoch konservierte Abschnitte sind an den äußeren Enden der  $\alpha$ -Helix in den Subdomänen 1A und 2B zu finden (Strelkov et al. 2002), die auch dahingehend in Erscheinung treten, dass Mutationen in diesen Bereichen besonders stark pathologische Phänotypen zur Folge haben (Coulombe und Omary 2002; Rugg und Leigh 2004).

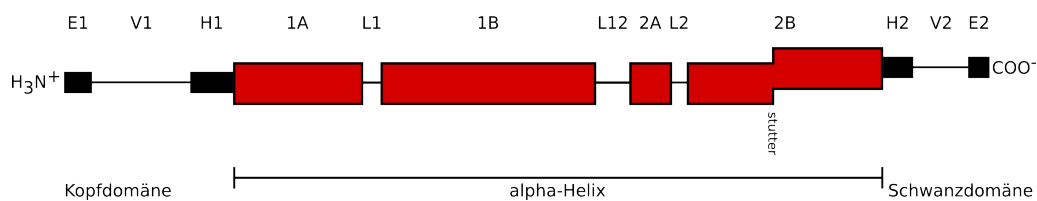


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zytokeratindimers

Im Bereich der 2B Domäne ist durch eine Unregelmäßigkeit in der Siebenerperiodizität, ein sogenannter 'stutter', für eine kurze Strecke die coiled-coil Struktur aufgewunden, wodurch die  $\alpha$ -Helices annähernd parallel werden. Dieser stutter ermöglicht offensichtlich eine bessere Zusammenlagerung der Dimere zum Filament (Waseem et al. 2004). Ein weiteres Merkmal, das in coiled-coils bildenden  $\alpha$ -Helices vorkommt ist ein trigger Motiv, das aus 13 Aminosäuren besteht. Dieses Motiv ist mit seiner klassischen Sequenz in den IF nicht vorhanden, es wurden jedoch funktionell und in der Aminosäureabfolge sehr ähnliche 'trigger sites' in K5/K14 gefunden, die essentiell für die Stabilität der coiled-coil Struktur sind. Da diese in den stark konservierten Bereichen der  $\alpha$ -Helices vorkommen, wird angenommen, dass dies IF übergreifend gilt (Wu et al. 2000).

Der nächste Schritt zum Aufbau eines Filamentes, ist die antiparallele Zusammenlagerung zweier Dimere zu einem Tetramer. Dabei ergeben sich durch Staffelung der beiden Dimere vier Kon-

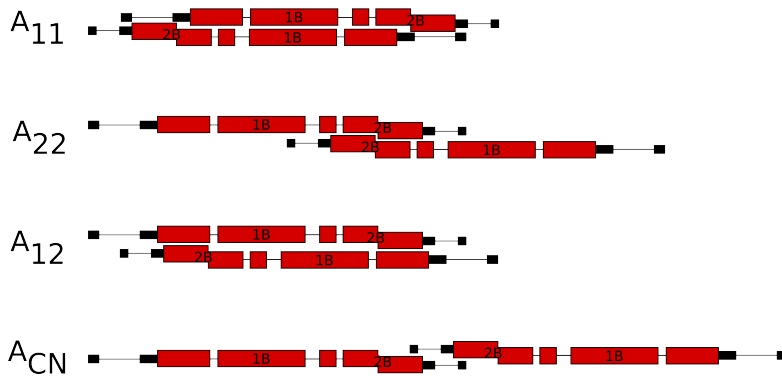


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Tetramerzusammenlagerung

formitäten: die 1B bzw. 2B Domänen liegen auf gleicher Höhe ( $A_{11}$  bzw.  $A_{22}$ ), die Moleküle liegen direkt gegenüber ( $A_{12}$ ), eine Sequenz von 5-10 Aminosäuren von Kopf und Schwanz überlappt sich ( $A_{CN}$ ). Während die  $A_{11}$  und  $A_{22}$  Assoziationen bereits bei Tetrameren auftreten

sind  $A_{12}$  und  $A_{CN}$  erst in Molekülen höherer Ordnung zu finden (Steinert et al. 1993).

Durch laterale Assoziation bilden sich sogenannte 'unit length filaments' (ULF) aus, die aus bis zu 16 Dimeren bestehen können. Durch longitudinale Anordnung der ULFs bildet sich nach und nach ein Filament aus, dass mit 16 nm Durchmesser deutlich größer ist als ein IF. Filamentinterne Umlagerungen führen dann zu einer radialen Verdichtung auf 11nm und zum reifen IF (Strelkov et al. 2003). Durch die antiparallele Anordnung der Dimere ergibt sich, im Gegensatz zu Mikrotubuli und Aktinfilamenten, eine unpolare Struktur des Filaments.

### 3.3 Keratine als Bestandteile des intrazellulären Netzwerks

Keratine bilden in der Zelle ein flexibles Netzwerk aus, das auf mechanische und nichtmechanische Belastung mit Umbau reagiert (Russell et al. 2004; Fickert et al. 2002). Dies kann auf verschiedene Weisen geschehen. Versuche mit Keratinvorstufen, die durch Mikroinjektionen in die Zelle gebracht wurden, haben gezeigt, dass diese sich rasch durch laterale Assoziation in das bestehende Netzwerk integrieren (Miller et al. 1991, 1993). Bei den Versuchen wurden große Mengen an Keratinen in die Zelle injiziert. Da aber die Menge an gelösten Keratinvorstufen unter physiologischen Bedingungen sehr klein ist (Wawersik et al. 1997; Chou et al. 1993), ist die Bedeutung der lateralen Assoziation als Umbauprozess für eine normale Zelle eher gering einzuschätzen (Windoffer et al. 2004). Der Großteil der Keratin Um- und Neubildung geht von der Zellperipherie, also von Regio-

nen unterhalb der Zellmembran aus. Welche Bestandteile im einzelnen als Keimzentren dienen ist nicht ganz geklärt, allerdings nehmen Fokalkontakte eine zentrale Stellung ein (Windoffer et al. 2006). Ein punktförmiges Partikel nimmt zunächst an Größe zu und geht dann durch Aneinanderlagerung von Keratinvorstufen in Längenwachstum über. Diese Fortsätze wachsen solange bis die Enden der entstehenden Filamente mit dem bestehenden Keratin-Netzwerk fusionieren (Windoffer et al. 2004). Daraus ergibt sich für die Zelle insgesamt ein zentripetales Wachstum der Keratinfilamente (Gu und Coulombe 2007).

Der Transport von keratinen Bestandteilen in der Zelle läuft über das Mikrotubulinetzwerk oder Aktinfilamente (Wöll et al. 2005). Im Gegensatz zum Transport an den Mikrotubuli ist der aktinfilament abhängige Transport langsam und nur in eine Richtung möglich, es gibt aber starke Hinweise, dass dieser einen deutlich größeren Anteil am intrazellulären Keratintransport hat (Helfand et al. 2004).

Proteine der Plakinfamilie sind Zytolinker, die die verschiedenen Bestandteile des Zytoskelettes, wie das Aktin- und Intermediärfilamentnetzwerk und die Mikrotubuli, sowie die Zellkontakte miteinander verbinden. Sie kommen besonders in Geweben mit hoher mechanischer Belastung vor (Leung et al. 2002). Bis auf den Microtubule-actin crosslinking factor (MACF) haben die anderen sechs Plakinproteine Einfluss auf das Intermediärfilament-Netzwerk (Sun et al. 2001). Desmoplakin verankert als Bestandteil der desmosomalen Plaque Keratinfilamente im Zellkontakt und trägt damit entscheidend zur strukturellen Integrität des Gewebes bei (Loranger et al. 2006). Plectin ist ein sehr vielseitiges Protein, da es sich mit den drei Netzwerken des Zytoskeletts und mit zahlreichen Zellkontakten verbinden kann. Gebunden an Intermediärfilamente fungiert es als Seitenarm, der sich mit Mikrotubuli verbindet (Svitkina et al. 1996). Außerdem verankert es Keratinfilamente in hemidesmosomalen Plaques (Wiche 1998). Weitere Plakine, die Verbindungen mit Keratinfilamenten eingehen, sind Bullous Pemphigoid Antigen 1 (BPAG-1), Envoplakin und Periplakin (Leung et al. 2002). Die Funktion des Epiplakin ist nicht geklärt, es scheint aber Einfluss auf die Integrität von Zellen einfacher Epithelien und bei der Keratinozytendifferenzierung zu haben (Jang et al. 2005; Spazierer et al. 2006). Ein weiteres wichtiges Keratinassoziiertes Protein ist das Filaggrin, das in der terminalen Differenzierung der Epidermis auftritt, und dort ein wichtiger Marker ist. Durch

Dephosphorylierung wird aus der Vorstufe Profilaggrin ein funktionelles Filaggrinmolekül, das eine Bündelung der Keratinfilamente bewirkt (Foisner und Wiche 1991). Eine Reihe weiterer Proteine gehen mit den Keratinen Verbindungen ein und beeinflussen ihre Struktur und Regulierung (Coulombe und Omary 2002).

## 4 Terminale Differenzierung der Keratinozyten

### 4.1 Begriffsklärung

Um die terminale Differenzierung zu verstehen und in die physiologischen Abläufe der Zelle und des Zellverbandes einordnen zu können, ist es wichtig sie von der Apoptose abzugrenzen.

Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einem kontrollierten Rückbau der Zellstruktur, ohne dass Nachbarzellen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden oder es zu einer entzündlichen Reaktion kommt. Daher spricht man bei der Apoptose auch von einer Form des kontrollierten oder programmierten Zelltodes. Die Bandbreite der Prozesse, in denen die Apoptose eingreift, ist groß. Während der Embryonalentwicklung gehen z. B. Zellen des Interdigitalhäutchens durch Apoptose zu Grunde, wodurch es zur Ausbildung der Finger kommt. Im zellulären Abwehrsystem kommt es bei der Auswahl der immunkompetenten Zellen zu einem umfangreichen Ausschuss, der immunologisch nicht effektiv ist und apoptotisch degeneriert wird. Die Homöostase der Gewebe wird durch die Gegenspieler Proliferation und Apoptose gewährleistet. Durch letztere werden gezielt alte Zellen aus dem Verband gelöst, abgebaut und somit eine Überalterung und Hyperproliferation des Zellverbandes verhindert (Raff 1998; Blank und Shiloh 2007).

Das Herzstück der Apoptose besteht aus einer Kaskade, die von proteolytischen Enzymen durch gegenseitige Aktivierung ausgelöst wird. Im Zentrum dieser Proteasen liegt Cystein. Die Bezeichnung Caspase für diese Enzyme leitet sich von der spezifischen Spaltung hinter Aspartat ab (engl: cysteiny-aspartate-cleaving protease). Erst durch Abspaltung der Prodomäne und einer weiteren Spaltung des Vorläuferproteins Procaspase können sich die entstehende große und kleine Untereinheit mit den homologen Spaltprodukten einer weiteren Procaspase zu einem Tetramer zu-



sammenlagern und die aktive Caspase bilden (Kaufmann und Hengartner 2001). Die bekannten vierzehn Caspasen lassen sich in zwei funktionelle Gruppen gliedern, eine inflammatorisch oder apoptotisch wirksame. Von den apoptotisch aktiven Caspasen sind 2, 8, 9, 10 und 12 Initiationscaspasen, welche die Effektorcaspasen aktivieren. Zu Effektorcaspasen gehören die Caspasen 3, 6, 7 und 14 (Ho und Hawkins 2005). Aktiviert bewirken sie die Lyse der Zelle, entweder direkt durch Spaltung zellulärer Substrate oder indirekt durch Aktivierung anderer lytischer Enzyme (Martelli et al. 2001; Lawen 2003).

Veränderungen der Plasmamembran ermöglichen die Phagozytose der apoptotischen Zelle. Durch Inhibition der Flippase, ein Enzym, welches die Verteilung der Phospholipide in der Doppellipidschicht der Zellmembran regelt, wandert Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Membran und markiert somit die eingeleitete Apoptose. In der Folge werden durch Auflösung der Zellkontakte und Blasenbildung der Plasmamembran einzelne Vesikel (apoptotic bodies) abgeschnürt, die anschließend durch Makrophagen oder benachbarte Zellen phagozytiert werden. Durch gleichzeitige Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine, wird eine entzündliche Reaktion verhindert (Lawen 2003).

Die Apoptose kann über zwei Mechanismen aktiviert werden, den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Beide bewirken eine Auslösung der Caspasen-Kaskade. Der intrinsische Weg kann durch verschiedene Reize, wie oxidativer Stress, zytotoxische Substanzen, Schädigungen der Zelle oder Ungleichgewicht der Überlebensfaktoren ausgelöst werden (Sanvicens und Cotter 2006; Nguyen und Hussain 2007; Raff 1998). Er wird auch Mitochondrien-abhängige Apoptose genannt, da das im Intermembranraum der Mitochondrien befindliche Zytochrom c eine zentrale Rolle spielt. Extrinsisch kann die Apoptose ausgelöst werden, indem Liganden an Rezeptoren binden, die auf der Oberfläche der Zellmembran exprimiert werden. Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren (TNF-R) sind typische Vertreter des extrinsischen Weges. Die Aktivierung der Caspasen-Kaskade durch den Fas-Rezeptor, der zu dieser großen Rezeptorengruppe gehört, wird in Abbildung 4 veranschaulicht. Den TNF-Rezeptoren ist gemein, dass sie eine zytoplasmatische 'death domain' (DD) haben, ihre Auswirkungen auf die Apoptose variieren jedoch (Bhardwaj und Aggarwal 2003). Reguliert wird die Apoptose intrazellulär vor allem durch die Proteine der Bcl-2 Familie, die sowohl

#### 4 Terminale Differenzierung der Keratinozyten

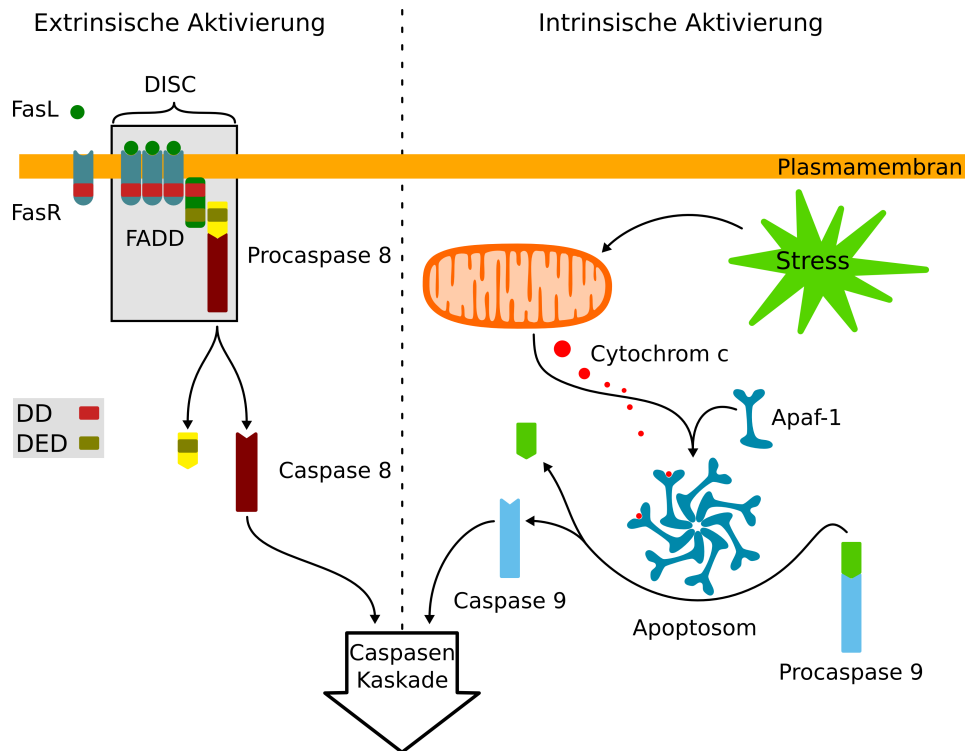


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Aktivierung der Caspasen Kaskade durch intrinsische und extrinsische Aktivierung. Abkürzungen: DD = death domain, DED = death effector domain, FasL = Fas Ligand, FasR = Fas Rezeptor, FADD = Fas-associated death domain protein, DISC = death-inducing signaling complex, Apaf-1 = apoptotic protease activating factor 1

anti-apoptotische (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) als auch pro-apoptotische Mitglieder hat (Bax, Bak, Bim, Bid, Bad u. a.). Die anti-apoptotischen Proteine wirken vor allem durch Bindung und Inhibition von pro-apoptotischen Markern, während Apoptose Promoter wie Bax eine wichtige Rolle bei der Cytochrom c Freisetzung spielen (Chan und Yu 2004). Die extrazelluläre Kontrolle erfolgt über die Ausschüttung von Überlebenssignalen wie Wachstumsfaktoren und Hormonen durch benachbarte Zellen. Fehlen diese Interaktionen, wird die Apoptose eingeleitet (Meredith et al. 1993).

Im Verlaufe der Differenzierung finden in den Keratinozyten Prozesse statt, die die Ausbildung einer Hornschicht ermöglichen. Im Golgi-Apparat der Zellen des Stratum spinosum werden Fettsäuren, Sphingolipide und Cholesterol synthetisiert, die in sogenannten membrane-coating granules (MCG), auch Keratinosomen oder Odland-Körper genannt, verpackt sind. Dort liegen sie als ty-

pische lamellenartige Lipidschichten vor. Diese Granula wandern zur Zellmembran, mit der sie in der späten Differenzierungsphase des Stratum granulosum fusionieren und exozytotisch ihren Inhalt in den Extrazellulärraum abgeben (Garant 2003). Parallel dazu findet die Ausbildung der cell envelope, einer verstärkten Zellhülle, statt. Diese setzt sich aus zahlreichen Proteinen zusammen, u. a. Filaggrin, Involucrin, Loricrin, Keratine, kleine prolinreiche Proteine (SPRR) und Bestandteile der Zellkontakte (Desmoplakin, Envoplakin und Plakoglobin) (Zeeuwen 2004), wobei die Zusammensetzung stark von Ort und Funktion des Epithels abhängig ist (Presland und Jurevic 2002). Regulierende Faktoren sind die in der inneren Schicht der Plasmamembran verankerten Transglutaminasen 1, 3 und 5, die die Vernetzung der Proteine katalysieren (Hitomi 2005).

Die cell envelope hat eine Stärke von etwa 15 nm wobei die Zellhülle eine Stärke von 10 nm hat, und die ausgeschütteten Lipide aus den MCG eine Stärke von 5 nm haben. Funktionell ist die cell envelope vor allem für die Erhaltung der physikalischen Integrität der Zelle und des Zellverbandes verantwortlich, während die in den Extrazellulärraum abgegebenen Lipide in erster Linie eine Wasserbarriere bilden (Steinert und Marekov 1999).

Der Verhornungssprung, also die Umwandlung der Zelle vom Stratum granulosum zum Stratum corneum, geschieht sehr rasch und geht mit der Lyse eines Großteils der Zellorganellen einher. Das Zytoplasma der degradierten Zellen besteht aus einem dichten Keratinnetzwerk, in dem, je nach Grad der Verhornung, ein pyknotischer (Parakeratinisierung) oder kein Zellkern (Orthokeratinisierung) vorhanden ist (Schröder 2000). Die Regulationsmechanismen und Signalwege, die die terminale Differenzierung steuern sind bisher nur wenig erforscht (Descargues et al. 2008). Von einigen Proteinen weiß man aber über ihren Einfluss auf den Differenzierungsprozess (Lefort und Dotto 2004).

Die zur Bcl-2 Familie gehörenden Bcl-xL und Bax sind in verschiedenen Zellschichten der Epidermis zu finden (Krajewski et al. 1994a,b). Es gibt widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Verteilung der Proteine. So konnten Krajewski et al. und Thamboo et al. Bcl-x vor allem im Stratum granulosum nachweisen, im Stratum basale, spinosum und corneum war es nicht oder nur sehr schwach nachweisbar (Krajewski et al. 1994b; Thamboo et al. 2006). Maruoka et al. konnten Bcl-xL *in vivo* im Stratum basale und den unteren Schichten des Stratum spinosum zeigen. Außerdem

beobachteten sie, dass Keratinozyten, die *in vitro* in einem Medium mit niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt angezüchtet wurden, einen hohen Bcl-xL Spiegel hatten. Wurden die Zellen in einem Medium mit erhöhtem  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt inkubiert, kam es neben einer höheren Expression von Differenzierungsmarkern (CK gp 56kDa, Involucrin) auch zu einem Anstieg des Bax (Maruoka et al. 1997).

Das proapoptotische Bax wird vor allem suprabasal im Stratum spinosum und granulosum exprimiert (Koçak et al. 2003), konnte aber auch im Stratum basale nachgewiesen werden (Krajewski et al. 1994a). Bax bindet die antiapoptotischen Marker Bcl-2 und Bcl-x und treibt die Zelle Richtung Apoptose. Über das Verhältnis zwischen Bax/Bcl-x und Bax/Bcl-2 lassen sich demnach Aussagen über die Anfälligkeit der Zelle für die Apoptose treffen (Oltvai et al. 1993; Ortiz et al. 2000). Hautkrankheiten wie Psoriasis und Morbus Darier, deren Symptom unter anderem eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten ist, gehen mit einer veränderten Expression von Bax, Bcl-x und Bcl-2 einher (Wrone-Smith et al. 1995; Yamamoto und Nishioka 2003; Koçak et al. 2003).

Eine Aktivität der Caspase 14 kann in den Zellschichten des Stratum granulosum nachgewiesen werden, wo sie Profilaggrin aus Keratohyalin granula spaltet und auf diese Weise das für die Ausbildung des Keratinnetzwerkes und des cell envelope notwendige Filaggrin bereitstellt (Nicotera und Melino 2007). Es wird vermutet, dass Caspase 14 bei der Lyse des Nucleus eine Rolle spielt (Alibardi et al. 2004). Caspase 14 ist eine der wenigen Caspasen, die keine aktive Funktion in der Apoptose hat, sondern für die terminale Differenzierung entscheidend ist. Entsprechend wird Caspase 14 nicht auf dem regulären Weg der Apoptose durch Initiationscaspasen aktiviert (Lippens et al. 2000). Die Regulationsmechanismen der Caspase 14 Expression bleiben bisher unklar, auch wenn es Hinweise gibt, dass sie über Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und  $\text{NF}\kappa\text{B}$  kontrolliert wird (Ballaun et al. 2008). Ob es eine posttranskriptionelle Regulation gibt ist unklar (Denecker et al. 2008).

Der Transkriptionsfaktor p63 gehört zur Familie der p53 Proteine, die für die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Tumorsuppression wichtig sind. Zwei Formen von p63 sind bekannt, die eine mit Transaktivierungsdomäne am N-Terminal (TAp63), die andere ohne ( $\Delta\text{Np63}$ ). Am C-Terminal sind drei Varianten der Aminosäuresequenz möglich, bei denen sich die beiden kürzeren Varianten p63 $\beta$  und p63 $\gamma$  von der längeren p63 $\alpha$  unterscheiden. Insgesamt existieren sechs

Varianten des p63 Proteins. Für die epidermale Entwicklung am bedeutendsten sind die  $\Delta$ Np63 Isoformen (Little und Jochemsen 2002). Die Funktion in der epidermalen Entwicklung ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass  $\Delta$ Np63 die Proliferation der epidermalen Basalzellen reguliert, da es im Stratum basale nachgewiesen wird (Parsa et al. 1999) und die Expression der basalen Zytokeratine 5 und 14 reguliert (Romano et al. 2009). Versuche mit p63<sup>-/-</sup> knockout Mäusen führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während eine Forschungsgruppe Hinweise für einen proliferativen Einfluss von p63 fand (Mills et al. 1999), zeigte eine andere eine mögliche differenzierende Wirkung (Yang et al. 1999; Candi et al. 2008). Eine Erklärung kann die unterschiedliche Wirkung und Funktion von  $\Delta$ Np63 und TAp63 sein. Man nimmt an, dass  $\Delta$ Np63 proliferativ wirkt und TAp63 dem untergeordnet einen differenzierenden Einfluss hat (Candi et al. 2006). Der I $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplex besteht aus drei Proteinen, von denen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  katalytisch sind und IKK $\gamma$  regulierend wirkt. Die Expression der katalytischen Untereinheit IKK $\alpha$  wird direkt durch p63 induziert (Marinari et al. 2009). IKK $\alpha$  ist ein wichtiger Faktor in der Regulierung der terminalen Differenzierung. IKK $\alpha$  knockout Mäuse bilden kein Stratum granulosum und Stratum corneum aus und verbleiben in einem proliferativen Status (Descargues et al. 2008). Für die Induktion der Differenzierung muss IKK $\alpha$  im Nucleus lokalisiert sein, die Kinaseaktivität ist nicht entscheidend (Sil et al. 2004).

Notch-1 gehört zur Gruppe der Notch Rezeptoren und ist ein Transmembranrezeptor. Seine Liganden sind beim Menschen die Delta- und die Serrate/Jagged Familie, die ebenfalls Oberflächenrezeptoren sind und auf ihrer großen extrazellulären Domäne Repeats der EGF-like Sequenz exprimieren (Six et al. 2003). Es kommt meist durch Zell-Zell-Kontakt zur Aktivierung der Notch-1 Rezeptoren, was bei der Anzüchtung und Differenzierung von Keratinozyten *in vitro* entscheidend ist (Kolly et al. 2005). Die Hochregulierung der Notch-1 Rezeptoren bewirkt eine Stimulation des p21<sup>WAF1/Cip1</sup> Proteins, welches im weiteren Verlauf einen Austritt der Basalzellen aus dem Zellzyklus bewirkt und den Beginn der Differenzierung initiiert (Rangarajan et al. 2001). Diese Funktion von Notch-1 in der Epidermis steht im Gegensatz zu anderen Geweben, in denen Notch-1 eine proliferierende Wirkung hat (Talora et al. 2008).

#### 4.2 Zusammenhang zwischen Apoptose und terminaler Differenzierung

Zwischen terminaler Differenzierung und Apoptose bestehen mehrere Parallelen. Beides sind komplexe, regulierte Prozesse an deren Ende der Untergang der Zelle steht. Neben den apoptotischen Regulatorproteinen der Bcl-2 Klasse sind unter anderem auch Transkriptionsfaktoren wie c-Myc und Proteine der p53 Familie in beiden Abläufen beteiligt. Es wird diskutiert, ob die terminale Differenzierung als Sonderform der Apoptose zu sehen ist, oder ein eigenständiges Phänomen ist (Gandarillas 2000), da es auch einige wesentliche Unterschiede gibt.

Die terminale Differenzierung ist ein andauernder, langsamer Prozess der bis zu zwei Wochen dauern kann und in einem simultanen Ablauf das gesamte epidermale Gewebe betrifft (Fuchs und Raghavan 2002). Aus proliferierenden Basalzellen mit Stamm-Zell Charakter entstehen Tochterzellen, die den Zellpool an Stammzellen aufrechterhalten, und transient amplifying cells (TA Zellen), die ein geringes proliferatives Potenzial von etwa fünf Teilungen haben. Die Tochterzellen der TA Zellen wiederum lösen sich von der Basalmembran und durchlaufen in ihrer weiteren Entwicklung die terminale Differenzierung (Zouboulis et al. 2008). Nachdem die Keratinozyten im Stratum spinosum und granulosum ein dichtes intrazelluläres Netzwerk aus Zytokeratinen gebildet haben, verlieren sie im Übergang zum Stratum corneum ihren Zellkern, bilden den cell envelope, flachen ab und lösen sich schließlich in Zellverbänden als Hautschuppen von der Oberfläche der Epidermis (Fuchs 2008).

Demgegenüber steht die Apoptose, die einzelne Zellen in einem Zellverband betrifft und ein schnell ablaufender Prozess ist. In der Zelle kommt es als Folge der Caspasen-Kaskade, durch die Aktivierung von Proteasen zur Chromatin Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns (van Engeland et al. 1997; Metcalfe und Streuli 1997; Lippens et al. 2005). Die Zelle wird durch Spaltung der Zellkontakte aus dem Zellverband gelöst, sie rundet ab und es kommt zu Vesikelabschnürungen. Diese apoptotischen Körperchen werden durch Nachbarzellen und Makrophagen phagozytiert.

Die Regulierung der terminalen Differenzierung ist zwar weniger beschrieben als die Regulierung und der Ablauf der Apoptose, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die terminale Differenzierung ein eigenständiger Prozess ist (Gandarillas 2000). Lippens et al. räumt ein, dass es Überschnei-

dungen der Prozesse gibt, da einige Proteine in beiden vorkommen, aber grundlegende histologische und molekularbiologische Unterschiede auf verschiedenen Ebenen vorhanden sind (Lippens et al. 2005). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass *in vitro* die Apoptose simultan zur terminalen Differenzierung auftreten kann (Bernerd und Asselineau 1997).

#### 4.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede epidermaler und oraler Keratinozyten

Wie die meisten mehrschichtigen Plattenepithelien, dient die Mundschleimhaut als Auskleidungs- und Deckschicht um den Körper vor schädlichen Reizen und Austrocknung zu schützen. Unterschiedliche lokale Erfordernisse an Epithelien bewirken Anpassungen des epithelialen Aufbaus. So schützt die Verhornung der Epidermis den Organismus vor Austrocknung, Epithelien im Körperinneren dagegen sind in der Regel durch Drüsensekrete permanent befeuchtet und meist unverhornt. Die Schichtstärke der Epithelien richtet sich stark nach der lokalen mechanischen Beanspruchung und liegt im Schnitt zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$  und kann sich an der Fußsohle bis zum zehnfachen verdicken (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Unterschiede im epithelialen Aufbau spiegeln sich in den Keratinozyten wieder, die das zelluläre Grundgerüst bilden. Gingivale Keratinozyten haben einen hohen Anteil an Keratinfilamentbündeln und eine vom Stratum basale zum Stratum granulosum zunehmende Expression von Desmosomen zur Erhöhung der Widerstandskraft gegenüber mechanischer Belastung. Epithelien auf beweglichem Untergrundgewebe, wie die Schleimhaut der Wangeninnenseite, haben einen hohen Anteil an ungebündelten Keratinfilamenten und damit eine deutlich höhere Dehnbarkeit als Epithelien auf knöchernem Untergrund (Schröder 2000).

Die Keratinexpression unterscheidet sich bei einfachen, nicht verhornenden und mehrschichtigen, verhornenden Epithelien. In mehrschichtigen, verhornenden Epithelien wie der Gingiva und Epidermis exprimieren die Keratinozyten im Stratum basale vornehmlich Keratin 5 und Keratin 14, suprabasal in hohem Maße Keratin 1 und Keratin 10. Keratine, die typischerweise in einfachen oder unverhornenden Epithelien wie dem Urothel, der Schleimhaut der Trachea und verschiedenen Drüsen exprimiert werden sind Keratin 8, 17, 18 und 19 (Moll et al. 1982)

Anders als in der Epidermis, ist die Auflösung des Zellkerns im Verlaufe der terminalen Differen-

zierung in der Gingiva häufig nicht vollständig. Dieser als Parakeratinisierung bezeichnete Prozess zeigt sich histologisch in einem pyknotischen Zellkernrest in den Zellen des Stratum corneum. Im Gegensatz zur Parakeratinisierung der Gingiva findet in der Epidermis eine Orthokeratinisierung mit vollständiger Auflösung der Zellkerns statt (Schröder 1981).

#### 4.4 Expressionsmuster ausgewählter Differenzierungsmarker

**Zytokeratin 2** wird nur suprabasal exprimiert beginnend in der dritten bis vierten Zellschicht der Epidermis. Dies wurde mittels Northern Blot, in situ Hybridisierung und immunhistochemisch nachgewiesen. Es tritt in höher differenzierten Zellschichten, im Ablauf der Differenzierung später als Zytokeratin 1 und früher als Filaggrin (Collin et al. 1992) auf.

**Zytokeratin 10** wird in verhornenden, mehrschichtigen Epithelien (Gingiva, harter Gaumen, Epidermis) suprabasal exprimiert, in der auskleidenden Mukosa ist K 10 nicht nachweisbar (Barrett et al. 1998). Es wird zu den Hauptmarkern der Differenzierung gezählt (Hansson et al. 2003).

**Zytokeratin 14** wird hauptsächlich basal exprimiert aber in gingivaler und palatinaler Schleimhaut auch fokal suprabasal (Barrett et al. 1998).

In mehrschichtigen, Epithelien bildet K14 zusammen mit K5 den Hauptanteil des Keratinnetzwerkes basaler Keratinozyten (Bragulla und Homberger 2009). Es wird angenommen, dass die Expression von K14 mit der mitotischen Aktivität und dem Grad der Pluripotenz von Zellen korreliert (Coulombe et al. 1989).

**Zytokeratin 17** wird in Epithelien mit einem hohen Zellumsatz exprimiert (Hansson et al. 2003) wie zum Beispiel während der Wundheilung und in Entwicklungsprozessen (Ektodermale Plakoden für Haare, Drüsen, Thymus und Zähne) (Bragulla und Homberger 2009). Außerdem ist es an der Formierung von Hautanhangsgebilden beteiligt (Wei et al. 2009).

**Zytokeratin 18** ist in der Gingiva nur in Merkel-Zellen nachzuweisen (Barrett et al. 1998). Es tritt meist in einfachen Epithelien auf (Hansson et al. 2003).

**Zytokeratin 19** wird hauptsächlich in fetalen Epithelien exprimiert, aber auch in Basalzellen nicht-keratinisierender Epithelien (Hansson et al. 2003) und in Merkelzellen verhornender Epithelien (Su et al. 1996). Es wird in proliferierenden Keratinozyten exprimiert (Pontiggia et al. 2009). Die Menge



der Keratinozyten, die K19 exprimieren nimmt mit dem Alter ab. So produzieren bei einem 2-7 Tage alten Kind 84% der Basalzellen K19, bei einem 2-5 Jahre alten Kind 9% und bei einem Erwachsenen (17-42 Jahre) 0,1% (Michel et al. 1996).

**Bax** gehört in die Gruppe der proapoptotischen Proteine und befindet sich je nach Differenzierungszustand der Keratinozyten im Zytosol (basal, proliferativ, undifferenziert) oder im Nucleus (suprabasal, differenziert). Bax kann in geringem Maße in allen Schichten der Epidermis nachgewiesen werden (Miller et al. 1991; Krajewski et al. 1994a). Es wird angenommen, dass Bax mit Beginn der Differenzierung zu den Mitochondrien wandert und dort die Zytochrom C Freisetzung auslöst. Daraufhin wandert es zum Nucleus wo es den Zellzyklus reguliert (Zuliani et al. 2007).

**Bcl-x** gibt es in zwei Molekül-Unterformen, Bcl-xS mit 170 Aminosäuren und das längere Bcl-xL mit 233 Aminosäuren. Beide haben unterschiedliche Funktionen in der Apoptose und einen anderen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen. Bcl-xS gehört zu den proapoptotischen Markern. Es konnte *in vitro* unter Zellkulturbedingungen nicht nachgewiesen werden (Ortiz et al. 2000; Wrone-Smith et al. 1995). Bcl-xL wird in suprabasalen Zellen exprimiert (Lippens et al. 2005), insbesondere im Stratum granulosum (Thamboo et al. 2006), konnte aber auch in basalen Zellschichten nachgewiesen werden (Maruoka et al. 1997; Krajewski et al. 1994b). Bcl-xL wirkt antiapoptotisch und schützt die Zelle vor extrinsischen und intrinsischen apoptotischen Stimuli (Pena et al. 1997).

**Caspase 14** wird hauptsächlich in verhornenden Epithelien exprimiert, außerdem in Hassall Körperchen des Thymus und im Magen von Nagern. Sie korreliert mit dem Verhornungsprozess und es wird angenommen, dass eine starke Verbindung zur terminalen Differenzierung besteht. In der Haut wird Caspase 14 in den verhornenden und sich differenzierenden Zellschichten nachgewiesen, sowie im Übergang des Stratum granulosum zum Stratum corneum. *In vitro* ist Caspase 14 in differenzierenden, nicht-proliferierenden Zellen nachweisbar. In unverhornendem Epithel, wie z. B. Schweißdrüsen und einfachen oralen Epithelien, kann sie nicht gezeigt werden. Caspase 14 ist beteiligt beim Abbau des Filaggrin. Ob direkt durch Spaltung des Filaggrin oder indirekt durch Aktivierung von Endonukleasen ist bisher nicht geklärt (Denecker et al. 2008).

## 5 Fragestellung und Hypothese

Die Fragestellungen die dieser Arbeit zugrunde liegen sind:

- Wie verändert sich das Expressionsmuster ausgewählter Zytokeratine und apoptotischer Marker im Verlauf der Differenzierung bei primären und immortalisierten, gingivalen Keratinozyten?
- Bestehen Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der Zytokeratine und Apoptosemarker bei primären und immortalisierten, gingivalen Keratinozyten?
- Welche Unterschiede bestehen zwischen primären und immortalisierten, gingivalen Keratinozyten in Hinblick auf Veränderungen der Expressionsmuster der ausgewählten Zytokeratine und Apoptosemarker?

Jede Fragestellung basiert auf folgenden Hypothesen, die die zu erwartenden Ergebnisse beschreiben.

- Diejenigen Zytokeratine, welche typischerweise in undifferenzierten Zellen hochexprimiert werden, werden im Laufe der Differenzierung herunterreguliert. Die differenzierungsanzeigenden Zytokeratine werden hochreguliert. Apoptosemarker treten in undifferenzierten Zellen nicht oder nur in geringem Maße auf. Die Expression der Apoptosemarker wird im Laufe der Differenzierung hochreguliert und folgt einem bestimmten Muster.
- Die Expressionsmuster von Zytokeratinen, welche undifferenzierte Zellstadien anzeigen, verändert sich gegenläufig zu den Expressionsmustern von Zytokeratinen, welche differenzierte Zellstadien anzeigen und zum Expressionsmuster der Apoptosemarker.
- Zwischen primären und immortalisierten humanen Keratinozyten bestehen keine grundsätzlichen Unterschiede bezüglich der Expressionsmuster von Zytokeratinen und Apoptosemarkern.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Medien, Lösungen und Puffer

Die Zusammensetzung der Medien basiert auf dem von Lauer beschriebenen Zellkulturmedium (Lauer 1994). Das hier verwendete serumfreie Proliferationsmedium wurde dahingehend modifiziert, dass die Inhaltsstoffe keinen Differenzierungsstimulus auf die Zellen ausüben.

Tabelle 4: serumfreies Proliferationsmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Ca <sup>2+</sup>	145,05 ml
Ham's F12 Flüssigmedium	48,35 ml
Hydrocortison (10 µg/ml)	8 µl
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	2,0 ml
Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamin (ITSX)	2,0 ml
Rekombinanter Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (rHu EGF)	2 µl
Choleratoxin	0,2 ml

Dem serumhaltigen Differenzierungsmedium wurde 10% fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt, um die Differenzierung der Zellen zu initiieren.

Tabelle 5: serumhaltiges Differenzierungsmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Ca <sup>2+</sup>	146,96 ml
Ham's F12 Flüssigmedium	48,98 ml
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	2,02 ml
Penicillin/Streptomycin	2,02 ml
Fetales Kälberserum (FCS)	10%

**Färbepuffer** (100 ml) wurde hergestellt aus 97 ml PBS<sup>-/-</sup>, 2 ml FCS und Zugabe von 1 ml Na<sup>+</sup> acid 2%ig. Dies entspricht einer Endkonzentration des FCS von 2% und des Na<sup>+</sup> acid von 0,02%.

**Hydrocortisonlösung** (10 µg/ml) wurde durch Auflösung von 0,0005 g Hydrocortison in 50 ml Ethanol hergestellt.

**Trypsin** (0,5%) wurde den Herstellerangaben entsprechend verdünnt (5 ml Trypsinkonzentrat auf 45 ml PBS<sup>-/-</sup>). Dies entspricht einer Endkonzentration von 0,05%.

**Fixierlösung auf PFA Basis** (1,5%) wurde durch Lösung von 1,5 mg Paraformaldehyd in 100 ml PBS<sup>-/-</sup> hergestellt. Mit NaOH und HCl wurde ein pH von 7,4 eingestellt.

### 6.2 Methoden

#### 6.2.1 Zelllinien

Die Untersuchungen zur Entwicklung eines 3D-Zellkulturmodells auf Basis von Gewebeproben freiwilliger Patienten, wurden genehmigt durch die Ethikkommission der Universität Gießen (Anfragenummer 22/05; erneuert 52/00).

Zur Probengewinnung primärer, humaner, gingivaler Keratinozyten (PHGK) wurden Biopsien von freiwilligen Patienten, die sich einem oralchirurgischen Eingriff im Bereich der Gingiva unterzogen, gewonnen. Das exzidierte Gewebe wurde in serumhaltigem Lauer-Medium (Lauer 1994) ins Labor transportiert und dort mit Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Magnesium und Kalzium (PBS<sup>-/-</sup>) gewaschen. Das Gewebe wurde in 2-4 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und in 10 cm<sup>2</sup> große Zellkulturschalen gegeben, denen serumfreies Medium modifiziert nach Lauer zugesetzt wurde. Nach 8-14 Tagen Wachstum bei 37°C, 92% relativer Feuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Zufuhr, wurden die Proben in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen umgesetzt (passagiert). Dafür wurden sie für 10 Minuten einem Standard Trypsinierungs Protokoll mit 0,05% Trypsin-EDTA unterzogen, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Zur Analyse wurden primäre, humane, gingivale Keratinozyten (PHGK) mit maximal fünf Passagen verwendet. Als Passage wird das Ablösen der adhären Zellen und ihre Weiterkultivierung in anderen Zellkulturflaschen bezeichnet.

Die Herstellung humaner, immortalisierter, gingivaler Keratinozyten (IHGK) erfolgte durch die Transfektion des Plasmid pLXSN-16E6E7 in gingivale Keratinozyten. Ihre Herstellung wurde in der

Poliklinik für Parodontologie des Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Gießen entwickelt und eingehend beschrieben (Gröger et al. 2008).

### 6.2.2 Zellkultivierung und Zelldifferenzierung in Zellkulturflaschen

Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 15 ml serumfreiem Medium kultiviert. Alle zwei Tage wurden die Kulturen mit 10 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und 15 ml neues Medium zugesetzt. Erreichten die Zellkulturen eine ausreichende Konfluenz (90%) wurden sie nach Bedarf auf weitere Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Zum Passagieren wurden die Zellen nach Verwerfen des verbrauchten Mediums mit 10 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Danach wurden sie mit 2 ml 0,05%iger Trypsinlösung beschickt und für 5-10 min inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden gelöst hatten. Der Ablösevorgang wurde mit mindestens 4 ml Kultivierungsmedium mit 5% FCS abgestoppt. Anschließend wurden je 3 ml der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche pipettiert und mit serumfreiem Medium auf 15 ml aufgefüllt.

Sobald durch die Proliferation der Zellen eine ausreichende Menge vorhanden war, wurde zur Ausdifferenzierung der Zellen das proliferationsinduzierende, serumfreie Kultivierungsmedium nach Spülung mit 10 ml PBS<sup>-/-</sup> durch das serumhaltige Differenzierungsmedium ersetzt. Dieses wurde alle zwei Tage nach Spülung mit 10 ml PBS<sup>-/-</sup> erneuert.

Bei der Zellkultivierung, Differenzierung und während der Anwendung des Trypsinierungsprotokolls wurden die Zellen in Zellkulturflaschen bei konstant 37°C, 92% relativer Feuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert. Die visuelle Kontrolle der Zellkulturen erfolgte unter dem Inversmikroskop (Diaphot, Nikon) mit 40-400facher Vergrößerung.

### 6.2.3 Zellfixierung aus Zellkulturflaschen

Um die verschiedenen Stadien der Differenzierung mit der entsprechenden Expression von Markern zu untersuchen, wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten entnommen. Die Fixierung

erfolgte im undifferenzierten Stadium, nach einem Tag, drei, sechs, neun und zwölf Tagen Differenzierung. Dementsprechend sind die Zeitpunkte der Entnahme und Fixierung der Zellen als T0, T1, T3, T6, T9 und T12 bezeichnet. Zur Fixierung wurden die Zellen mit 10 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Zum schonenden Ablösen der Zellen wurden sie mit 2 ml Accutase beschickt. Die Inkubation dauerte 20-40 min bis sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten. Mit 8 ml serumfreiem Kultivierungsmedium mit 5% FCS wurden die Zellen resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Lösung wurde bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml 1,5% Paraformaldehyd in PBS<sup>-/-</sup> mit pH 7,4 resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 10 ml Färbepuffer (siehe 6.2.1) gewaschen und zentrifugiert (1400 U/min, 5 Min). Das Pellet wurde in 10 ml kaltem 90% Methanol resuspendiert und die Zellsuspension bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

### 6.2.4 Zellkultivierung und Zelldifferenzierung auf Zellkultureinsätzen

Nach der Anzucht der Zellen in Zellkulturflaschen, wurden sie auf kollagenbeschichteten Zellkultureinsätzen (Costar 6,5mm Transwell-COL, Corning) mit einer Konzentration von  $3,25 \times 10^5$  Zellen/Einsatz in serumfreiem Medium ausgesät. Die Zellkultureinsätze wurden in eine 24-well Zellkulturplatte gesetzt dessen basales Kompartiment 900  $\mu$ l und das apikale 400  $\mu$ l des entsprechenden Mediums beinhaltet. Zur Ausdifferenzierung der Zellen wurde nach einem Tag das proliferationsinduzierende und serumfreie Medium durch das serumhaltige Differenzierungsmedium ersetzt. Das verbrauchte Medium wurde täglich durch frisches ersetzt. Während der Zellkultivierung und Differenzierung wurden die Zellen auf den Zellkultureinsätzen bei konstant 37°C, 92% relativer Feuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert. Die visuelle Kontrolle der Zellkulturen erfolgte unter dem Inversmikroskop (Diaphot, Nikon) mit 40-400facher Vergrößerung.

### 6.2.5 Zellfixierung von Zellkultureinsätzen

Die Zellen wurden wie in den Zellkulturflaschen im undifferenzierten Stadium, nach drei und zwölf Tagen Differenzierung fixiert. Dementsprechend sind die Zeitpunkte der Fixierung als T0, T3 und T12 bezeichnet. Zur Fixierung wurde das verbrauchte Medium verworfen und die apikalen Kompartimente der Zellkultureinsätze mit jeweils 400  $\mu\text{l}$  PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend mit 400  $\mu\text{l}$  Accutase beschickt. Die Zellen wurden für 40 min bei 37°C, 92% relativer Feuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert und die Ablösung der Zellen von der Zellmembran mikroskopisch kontrolliert. Die Accutase mit den darin gelösten Zellen wurde gesammelt und mit 600  $\mu\text{l}$  serumhaltigem Zellkulturmedium (5%) je Zellkultureinsatz resuspendiert. Die Zellzahl der Suspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Lösung wurde bei 1400 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml 1,5% Paraformaldehyd in PBS<sup>-/-</sup> mit pH 7,4 resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 10 ml Färbepuffer (siehe 6.1.1) gewaschen und zentrifugiert (1400 U/min, 5 Min). Das Pellet wurde in 10 ml kaltem 90% Methanol resuspendiert und die Zellsuspension bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

### 6.2.6 Durchflusszytometrie

Die Expression intrazellulärer Marker der Keratinozyten wurde mittels Durchflusszytometrie charakterisiert und quantifiziert. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. Die Immunfärbung wurde mit verschiedenen Antikörpern vorgenommen, welche jeweils spezifisch an K2, K10, K14, K17, K18, K19, Caspase 14, Bax und Bcl-xL binden.

Für die Antikörperfärbung wurden die permeabilisierten, fixierten und eingefrorenen Zellen zweimal mit Färbepuffer gewaschen und jede Probe in 100  $\mu\text{l}$  Färbepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 30 Minuten bei 4°C mit der Negativkontrolle präinkubiert und anschließend erneut zweimal gewaschen. Diese Form der Prä-Inkubation wurde gewählt, da der übliche Einsatz von Ziegen Serum nicht zu einer ge-

nügenden Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen führte. Die Zelllösung wurde dann mit dem primären Antikörper für 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Färbepuffer wurden die Proben mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 50 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Färbepuffer gewaschen, in PBS<sup>-/-</sup> resuspendiert und durch einen 50 µm Filter gegeben. Die Analyse im Durchflusszytometer erfolgte mit einem 488 nm Laser. Die Zellen wurden auf Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität (530 nm Filter) hin untersucht.



### 6.2.7 Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen der in Zellkulturflaschen angezüchteten Zellen, wurden als Histogramme dargestellt, die auf der Ordinate die Counts, also die analysierten Ereignisse, und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität in logarithmischer Darstellung zeigten. Zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität wurde ein Gate (R1) um die Glockenkurve gelegt und die statistischen Werte ausgelesen.

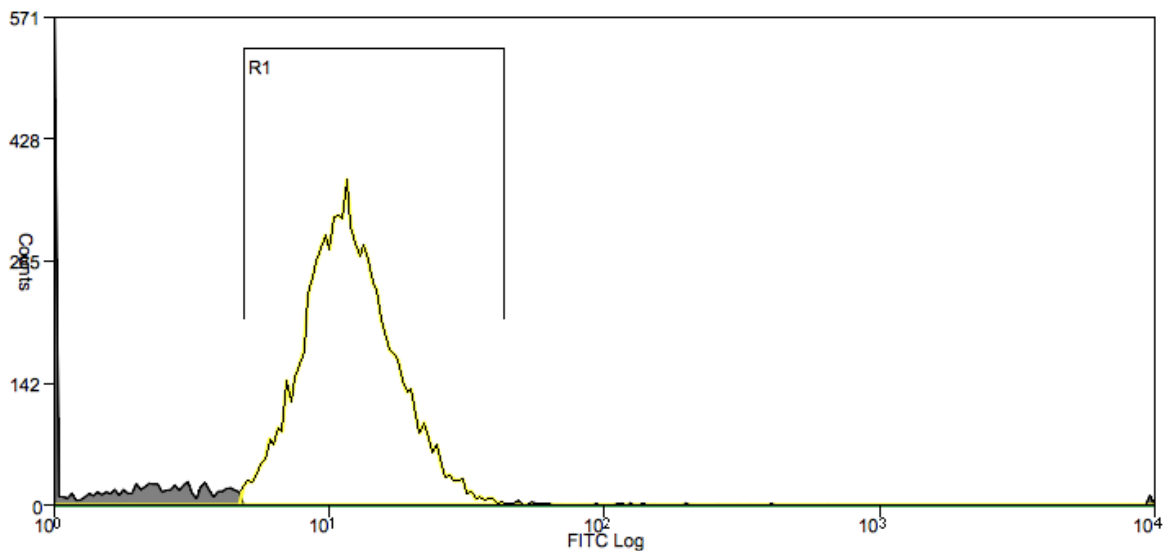


Abbildung 5: **Auswertung der Histogramme:** Exemplarisch ist hier das Histogramm der mit der Isotyp Kontrolle gefärbten IHGK des zweiten Versuches im undifferenzierten Zustand dargestellt.

R1 markiert die um die Glockenkurve gelegte Region, die Kurve ist in diesem Bereich gelb gefärbt. Die mit der Software Summit durchgeführte statistische Analyse ergab für die gesamte Kurve (Total) und die mit dem Ausschnitt ausgewählten Bereich (R1) folgende Werte:

Tabelle 6: Werte der Histogramm Analyse der Zellen aus Zellkulturflaschen

Region	Anzahl aller Ereignisse	Anteil Histogramm	Anteil Gesamt	Grenzen
Total	10000	100,00	100,00	(1,00;10000,01)
Gate R1	9152	91,52	91,52	(4,90;49,44)

Region	Anzahl des häufigsten Wertes	häufigster Wert	Mittelwert	Median
Total	316	11,25	26,50	12,09
Gate R1	316	11,25	13,99	12,53

Region	Standardabweichung	VK	VK (hm)	Symmetrie
Total	353,55	1334,09	44,36	27,67
Gate R1	6,54	46,78	44,36	1,61

**Region:** Der Bereich der statistischen Analyse; **Anzahl aller Ereignisse;** **Anteil Histogramm:** Prozentualer Anteil der Ereignisse relativ zu Ereignissen des Histogramms; **Anteil Gesamt:** Prozentualer Anteil der Ereignisse relativ zu Gesamtereignissen des Ursprungshistogramms; **Grenzen:** obere und untere Grenze eines Histogramms oder einer Region; **Anzahl des häufigsten Wertes:** Anzahl der Ereignisse der Säule mit den meisten Ereignissen; **Häufigster Wert:** Wert mit der höchsten Anzahl an Ereignissen; **Mittelwert:** gewichteter Mittelwert; **Median:** Wert, über und unter dem die Hälfte aller Werte liegen; **Standardabweichung;** **VK:** Variationskoeffizient; **VK (hm):** Variationskoeffizient (Halbmaximal); **Symmetrie:** Symmetrieverteilung (linksschief = negativ, rechtsschief = positiv)

Der Abszissenwert des gewichteten Mittelwertes der Region (R1) wurde erfasst. Dieser entspricht der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die durch die Färbung gebundenen Antikörper. Aus den drei Werten der Versuchswiederholungen (n=3) jedes Zelltyps (PHGK und IHGK) wurde der Mittelwert bestimmt. Zu diesem wurde die Standardabweichung ermittelt und die Werte in Säulendiagrammen graphisch dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurden die Werte einem unabhängigen Zweistichproben t-Test unterzogen und die Werte der gefärbten Zellen in Abhängigkeit zu den Werten der entsprechenden Negativkontrolle untersucht. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,05$  (\*) gewählt.

Die Fluoreszenzwerte der auf den Zellkultureinsätzen angezüchteten immortalisierten Zellen wurden anhand von Diagrammen, welche auf der Ordinate die Zellgröße (FS) in linearer und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität in logarithmischer Darstellung zeigen, ermittelt.

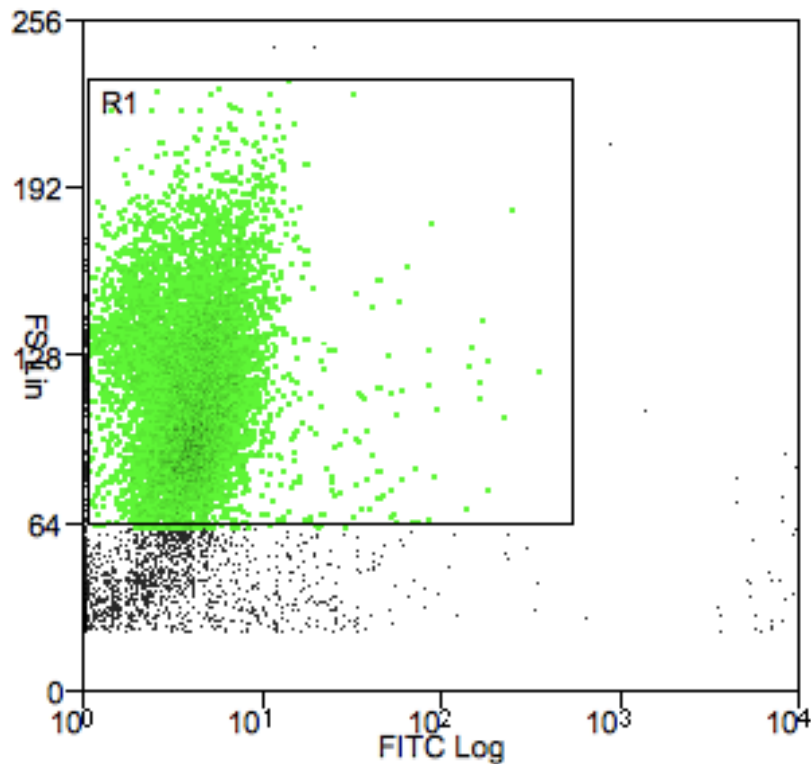


Abbildung 6: **Auswertung der Histogramme:** Exemplarisch ist hier eine Punktwolke der mit der Isotyp Kontrolle gefärbten IHGK des dritten Versuches nach 12 Tagen in Differenzierungsmedium dargestellt. Die durch die Region R1 ausgewählten Ereignisse sind grün markiert.

Auf Basis der Vorversuche wurde innerhalb der Diagramme der Bereich (R1) ausgewählt, in dem die Werte der Zellgröße für Keratinozyten zu erwarten waren. Oberhalb des ausgewählten Bereiches treten zumeist Zellkonglomerate auf, darunter Zellreste und Zelltrümmer. Durch die in Abbildung 6 vorgenommene Eingrenzung der Fluoreszenzwerte (R1), ergab sich die in Abbildung 7 gezeigte Werteverteilung mit den Ereignissen (Counts) auf der Ordinate und der Fluoreszenzin-

tensität auf der Abszisse. Dargestellt ist die Gesamtzahl aller Werte der Antikörperanalyse (weiß), Werte innerhalb R1 (farblich markiert) und Werte ausserhalb R1 (grau).

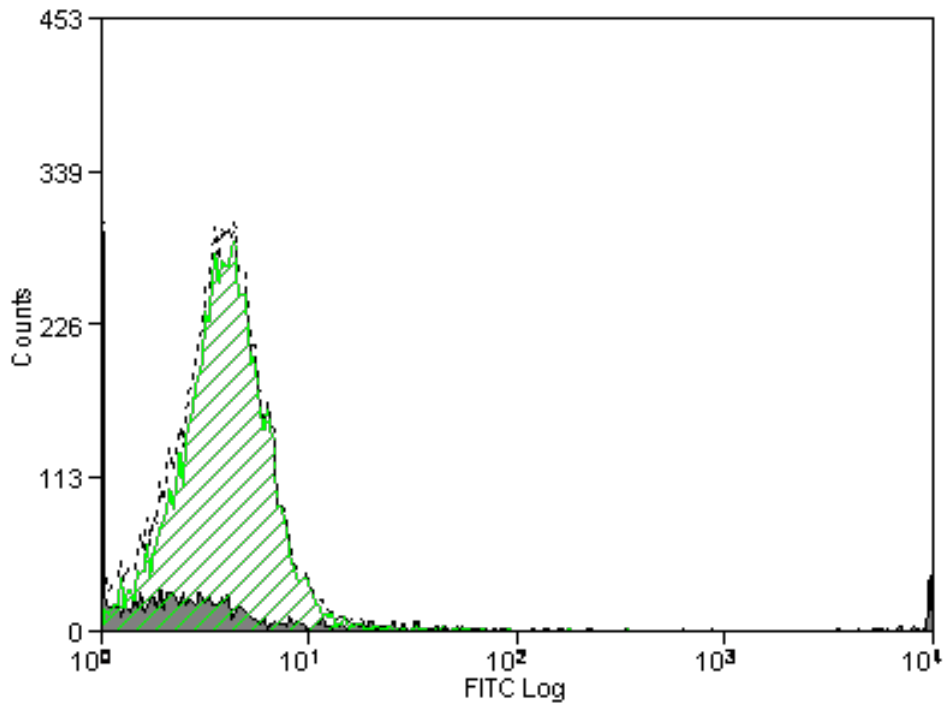


Abbildung 7: **Auswertung der Histogramme:** Exemplarisch ist hier das Histogramm der mit der Isotyp Kontrolle gefärbten IHGK des dritten Versuches nach 12 Tagen in Differenzierungsmedium dargestellt. Gesamtzahl der Werte (weiss), Eingegrenzter Bereich (grün), Werte ausserhalb des Analysebereichs (grau)

Die Werte für die Gesamtzahl aller Ereignisse und den ausgewählten Bereich R1 wurden durch die Software entsprechend der Tabelle 6 ausgegeben und ausgewertet.

### 6.2.8 Messung und Berechnung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER)

Zur Messung des TER wurden immortalisierte, humane gingivale Keratinozyten wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben auf Zellkultureinsätzen angezüchtet. Die Messung erfolgte mit einem Widerstandsmessgerät, welches das Membranpotential und den elektrischen Widerstand epithelialer Zellen *in vitro* misst.

Vor jedem Mediumwechsel wurden die Werte der TER-Messung an drei Stellen je Zellkultureinsatz erhoben. Als Nullwert wurde ein Zellkultureinsatz mitgeführt, der nicht mit Zellen bewachsen war. Für die Analyse wurden die Werte der Zellkultureinsätze herangezogen, die die gesamte Differenzierungsdauer von zwölf Tagen durchliefen.

Für die Ermittlung des TER wurde der Mittelwert dreier gemessener Werte eines Zellkultureinsatzes berechnet. Der Mittelwert wurde mit der Fläche des Zellkultureinsatzes ( $0,66 \text{ cm}^2$ ) multipliziert. Von diesem Gesamtwiderstand wurde der Widerstandswert des Zellkultureinsatzes ohne Zellpopulation (Blank) subtrahiert, um den nicht durch Zellen hervorgerufenen Widerstand herauszurechnen. Der erhaltene Wert gibt den TER in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  an.

Für die graphische Darstellung wurden zu den berechneten TER-Werten der drei Zellpopulationen jedes Differenzierungszeitpunktes der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Diese wurden in ein Diagramm mit der Differenzierungszeit in Tagen auf der Abszisse und dem TER in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  auf der Ordinate übertragen.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Aussaat in Zellkulturflaschen

#### 7.1.1 Analyse immortalisierter humaner gingivaler Keratinozyten (IHGK) im Durchflusszytometer

##### Negativkontrolle

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit Isotyp-Kontrolle inkubierten IHGK lag zu den verschiedenen Zeitpunkten bei einem annähernd konstanten Wert.

Tabelle 7: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Isotyp-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	14,61	12,42	12,09	12,68	12,09	12,95
Versuch 2	IHGK	12,98	13,76	13,65	13,02	13,28	13,19
Versuch 3	IHGK	13,99	12,55	12,68	11,14	13,02	12,18
Mittelwert		13,86	12,91	12,81	12,28	12,80	12,77
Standardabweichung		0,82	0,74	0,79	1,00	0,63	0,53

## Zytokeratin 2

Die MFI der IHGK mit Zytokeratin 2 Immunfärbung lag deutlich höher als die Werte der Negativkontrolle. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte zeigte sich eine erhöhte Schwankungsbreite der MFI ohne erkennbare abnehmende oder zunehmende Tendenz.

Tabelle 8: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 2-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	85,00	164,89	192,98	107,66	108,73	159,40
Versuch 2	IHGK	135,15	146,01	143,66	193,08	176,40	205,87
Versuch 3	IHGK	166,46	127,61	101,04	110,75	97,74	170,81
Mittelwert		128,87	146,17	145,89	137,16	127,62	178,69
Standardabweichung		41,09	18,64	46,01	48,45	42,60	24,22
p-Wert		0,008	0,000	0,007	0,011	0,010	0,000

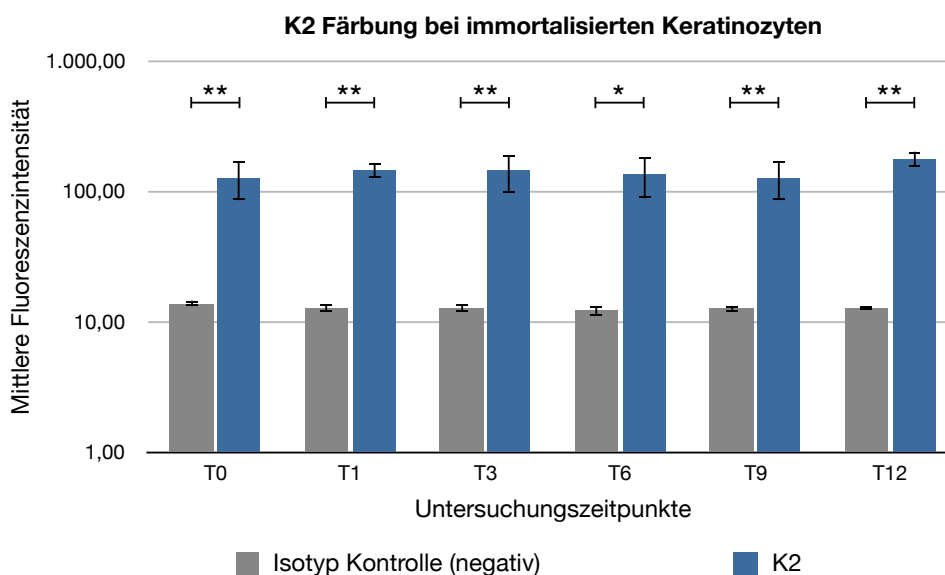


Abbildung 8: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 2 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

## Zytokeratin 10

Die MFI der IHGK mit Zytokeratin 10 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle größer. Zwischen T0 und T1 gab es eine geringe Abnahme der MFI. Im weiteren zeitlichen Verlauf blieben die Werte konstant und zeigten eine geringen Schwankung.

Tabelle 9: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin10-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	31,77	27,25	25,68	24,72	19,99	16,63
Versuch 2	IHGK	35,68	16,67	23,43	19,64	24,88	28,67
Versuch 3	IHGK	23,02	25,49	23,03	18,61	25,93	23,25
Mittelwert		30,16	23,14	24,05	20,99	23,60	22,85
Standardabweichung		6,48	5,67	1,43	3,27	3,17	6,03
p-Wert		0,012	0,036	0,000	0,012	0,004	0,045

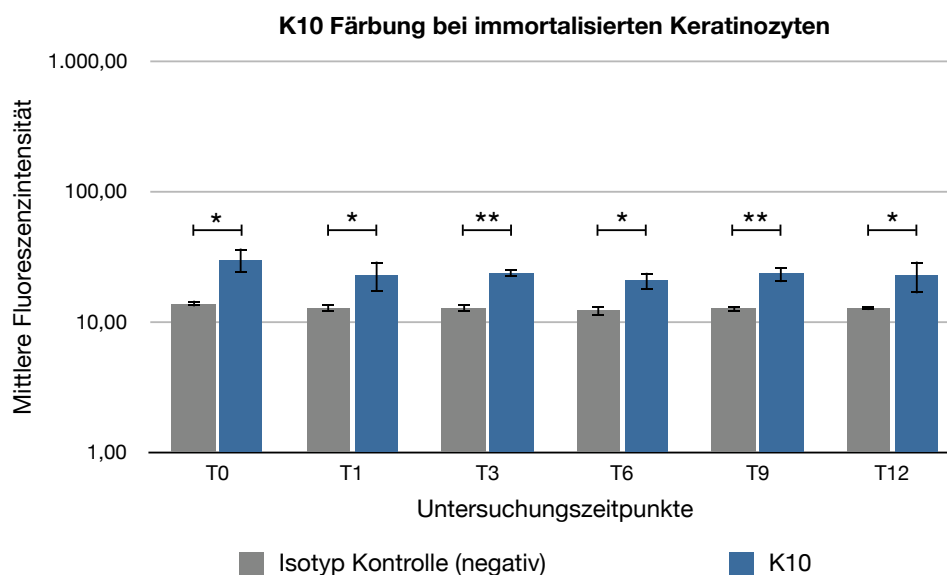


Abbildung 9: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 10 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$



## Zytokeratin 14

Die MFI der IHGK mit Zytokeratin 14 Immunfärbung war vergleichbar mit den entsprechenden Werten der Negativkontrolle und zeigte im zeitlichen Verlauf kaum Schwankungen.

Tabelle 10: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 14-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	16,24	12,55	11,86	12,84	14,39	12,54
Versuch 2	IHGK	12,28	11,36	10,58	10,35	11,50	11,38
Versuch 3	IHGK	12,62	11,95	10,61	9,02	8,80	9,24
Mittelwert		13,71	11,95	11,02	10,74	11,56	11,05
Standardabweichung		2,20	0,60	0,73	1,94	2,80	1,67
p-Wert		0,919	0,156	0,045	0,288	0,497	0,165

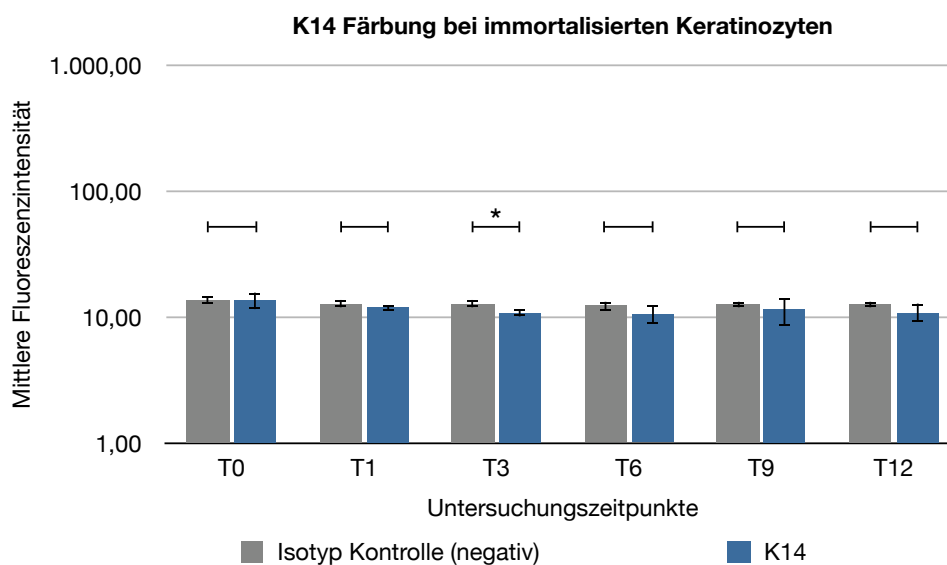


Abbildung 10: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 14 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

## Zytokeratin 17

Die MFI der IHGK mit Zytokeratin 17 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle, größer. Über den zeitlichen Verlauf war ein geringer Anstieg der MFI zu sehen.

Tabelle 11: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 17-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	19,94	22,73	19,79	22,24	31,03	21,06
Versuch 2	IHGK	16,01	16,31	30,23	22,87	21,77	26,52
Versuch 3	IHGK	22,56	22,91	20,29	18,70	21,81	30,34
Mittelwert		19,50	20,65	23,44	21,27	24,87	25,97
Standardabweichung		3,30	3,76	5,89	2,25	5,33	4,66
p-Wert		0,045	0,025	0,036	0,003	0,018	0,008

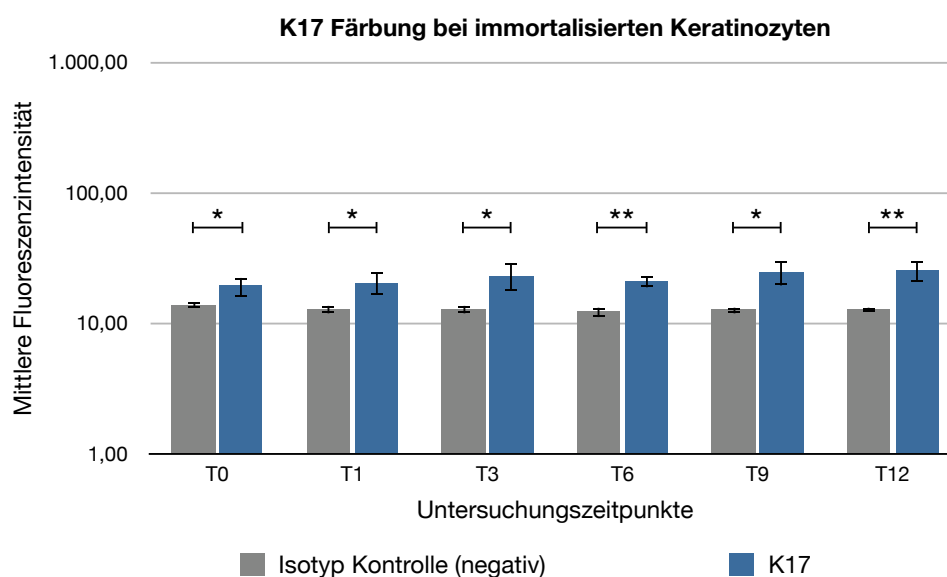


Abbildung 11: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 17 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

## Zytokeratin 18

Die MFI der IHGK mit Zytokeratin 18 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle, deutlich größer. Die MFI nahm bis zum Zeitpunkt T3 leicht zu und fiel dann bis T9 wieder auf den Wert von T0 ab.

Tabelle 12: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 18-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	60,03	100,20	169,37	139,99	64,84	40,18
Versuch 2	IHGK	99,91	77,08	106,62	62,19	64,43	92,99
Versuch 3	IHGK	41,84	123,03	96,08	102,71	93,12	78,74
Mittelwert		67,26	100,10	124,02	101,63	74,13	70,64
Standardabweichung		29,70	22,98	39,62	38,91	16,45	27,32
p-Wert		0,036	0,003	0,008	0,016	0,003	0,021

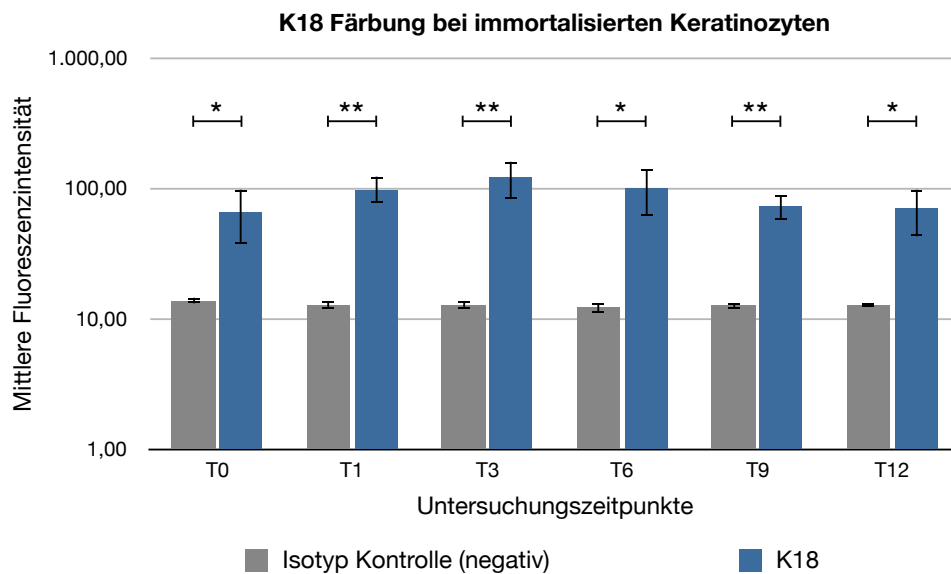


Abbildung 12: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 18 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

## Zytokeratin 19

Die MFI der IHGK mit Zytokeratin 19 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle, deutlich größer. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Messungen zeigte sich eine niedrige Schwankung ohne erkennbare abnehmende oder zunehmende Tendenz der MFI.

Tabelle 13: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 19-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	81,74	79,67	109,60	108,45	106,06	85,61
Versuch 2	IHGK	107,83	101,82	115,16	87,77	94,76	115,16
Versuch 3	IHGK	97,53	86,16	90,32	91,84	83,94	122,16
Mittelwert		95,70	89,22	105,03	96,02	94,92	107,64
Standardabweichung		13,14	11,39	13,04	10,96	11,06	19,40
p-Wert		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001

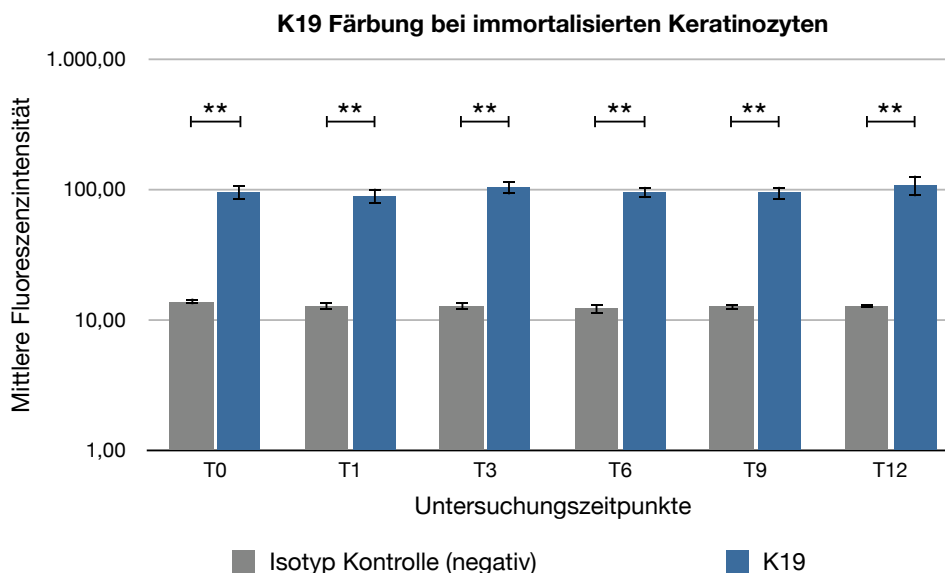


Abbildung 13: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 19 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

**Bax**

Die MFI der IHGK mit Bax Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle deutlich größer. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte zeigte sich eine geringe Schwankungsbreite mit einer Zunahme bis T3, einem Abfall an T6 und einem erneuten Anstieg bis T12 auf das Niveau des Zeitpunktes T3.

Tabelle 14: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Bax-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	100,15	149,55	213,40	173,68	177,45	138,34
Versuch 2	IHGK	123,86	184,63	202,13	157,24	152,51	229,42
Versuch 3	IHGK	157,85	149,46	154,54	111,01	155,49	148,24
Mittelwert		127,29	161,21	190,02	147,31	161,82	172,00
Standardabweichung		29,00	20,28	31,24	32,49	13,62	49,97
p-Wert		0,002	0,000	0,001	0,002	0,000	0,005

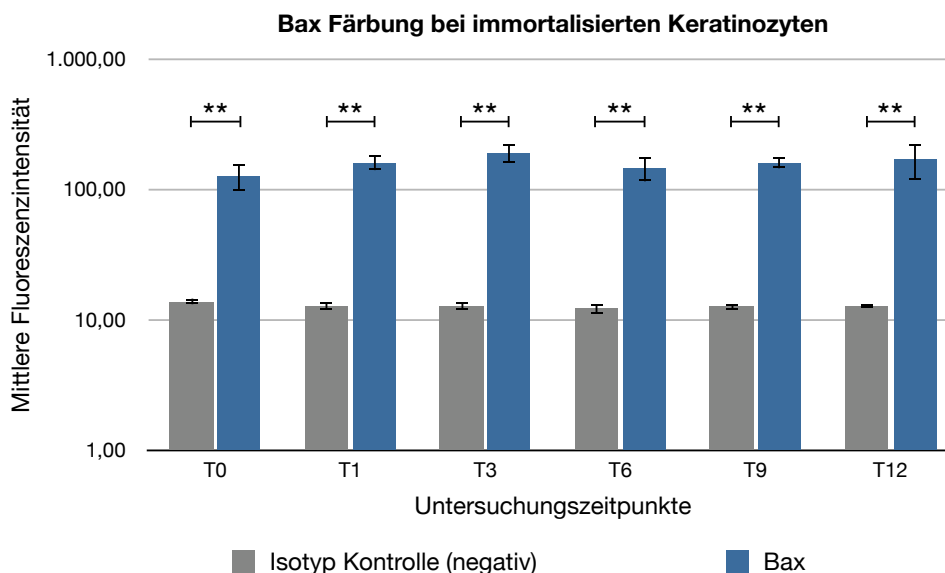


Abbildung 14: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Bax Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

**Bcl-x**

Die MFI der IHGK mit Bcl-x Immunfärbung entsprach den Werten der Negativkontrolle. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Messpunkte zeigte sich eine leichte Zunahme des Wertes zum Zeitpunkt T3. Diese etwas höhere MFI blieb bis zum Zeitpunkt T12 stabil.

Tabelle 15: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Bcl-x-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	13,27	12,85	16,39	19,87	15,61	15,85
Versuch 2	IHGK	12,28	9,60	16,82	15,21	17,74	21,07
Versuch 3	IHGK	12,69	11,74	15,02	13,74	14,75	14,29
Mittelwert		12,75	11,40	16,08	16,27	16,03	17,07
Standardabweichung		0,50	1,65	0,94	3,20	1,54	3,55
p-Wert		0,115	0,221	0,010	0,108	0,028	0,107

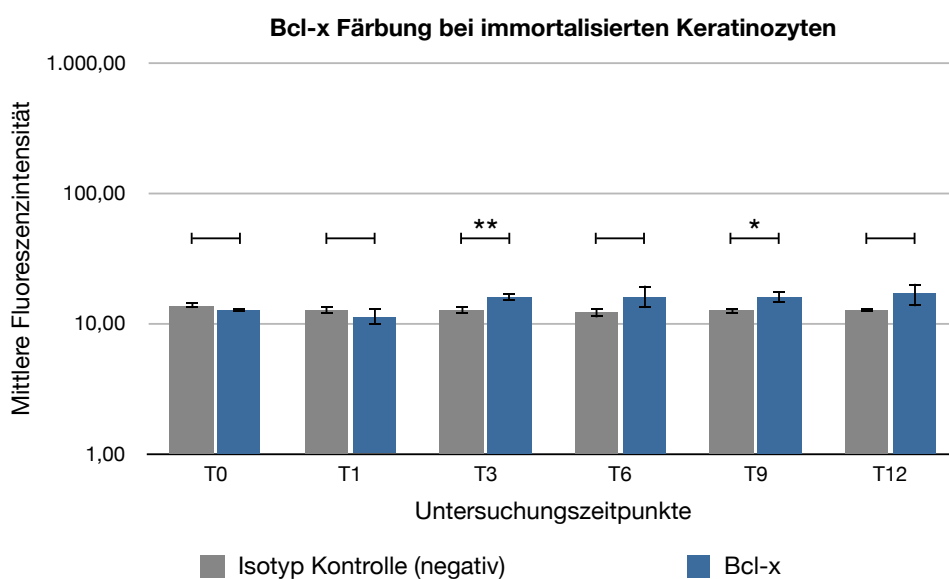


Abbildung 15: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Bcl-x Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

## Caspase 14

Die MFI der IHGK mit Caspase 14 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle deutlich größer. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte zeigte sich eine geringe Schwankungsbreite ohne erkennbare abnehmende oder zunehmende Tendenz der MFI.

Tabelle 16: MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Caspase 14-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	IHGK	607,75	648,21	502,87	526,86	450,71	618,02
Versuch 2	IHGK	597,68	323,45	464,16	462,66	487,70	846,46
Versuch 3	IHGK	576,48	593,60	433,14	422,73	534,36	575,04
Mittelwert		593,97	521,75	466,72	470,75	490,92	679,84
Standardabweichung		15,96	173,89	34,94	52,53	41,92	145,89
p-Wert		0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,001

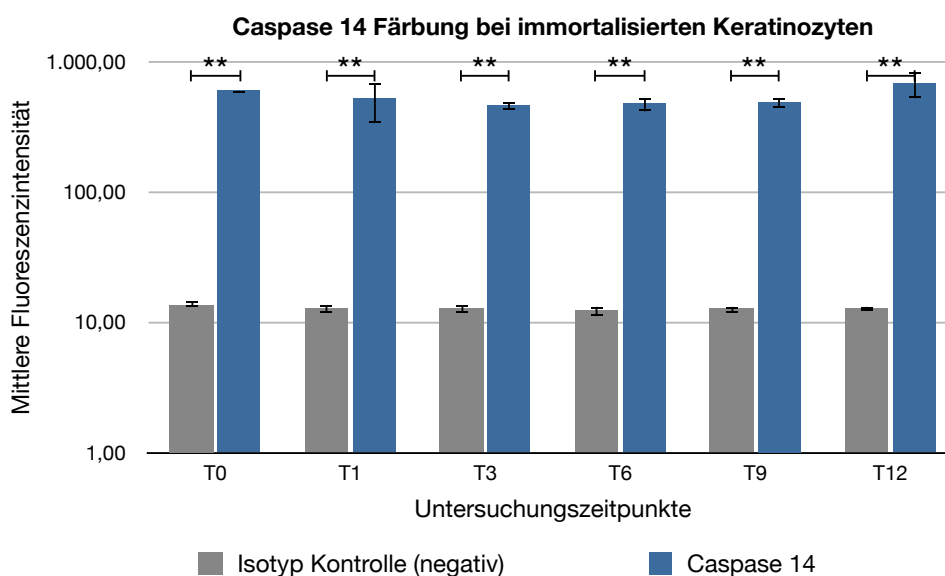


Abbildung 16: **MFI der IHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Caspase 14 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

**7.1.2 Analyse primärer humaner gingivaler Keratinozyten (PHGK) im Durchflusszytometer**

**Negativkontrolle**

Die MFI der mit Isotyp-Kontrolle inkubierten PHGK lag zu den verschiedenen Zeitpunkten bei einem annähernd konstanten Wert.

Tabelle 17: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Isotyp-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	8,36	9,22	12,85	11,85	13,15	14,28
Versuch 2	PHGK	15,02	9,91	11,77	12,66	12,55	15,63
Versuch 3	PHGK	10,45	14,10	12,75	9,01	10,14	10,09
Mittelwert		11,28	11,08	12,46	11,17	11,95	13,33
Standardabweichung		3,41	2,64	0,60	1,92	1,59	2,89



## Zytokeratin 2

Die MFI der PHGK mit Zytokeratin 2 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle deutlich größer. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte zeigte sich eine leichte Zunahme der MFI, wobei zum Zeitpunkt T9 ein Rückgang zu sehen war.

Tabelle 18: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 2-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	96,58	111,82	178,92	150,41	151,35	207,75
Versuch 2	PHGK	180,32	189,25	135,35	212,47	168,30	242,69
Versuch 3	PHGK	70,28	145,16	217,78	201,39	178,83	181,48
Mittelwert		115,73	148,74	177,35	188,09	166,16	210,64
Standardabweichung		57,46	38,84	41,24	33,10	13,86	30,71
p-Wert		0,035	0,004	0,002	0,001	0,000	0,000

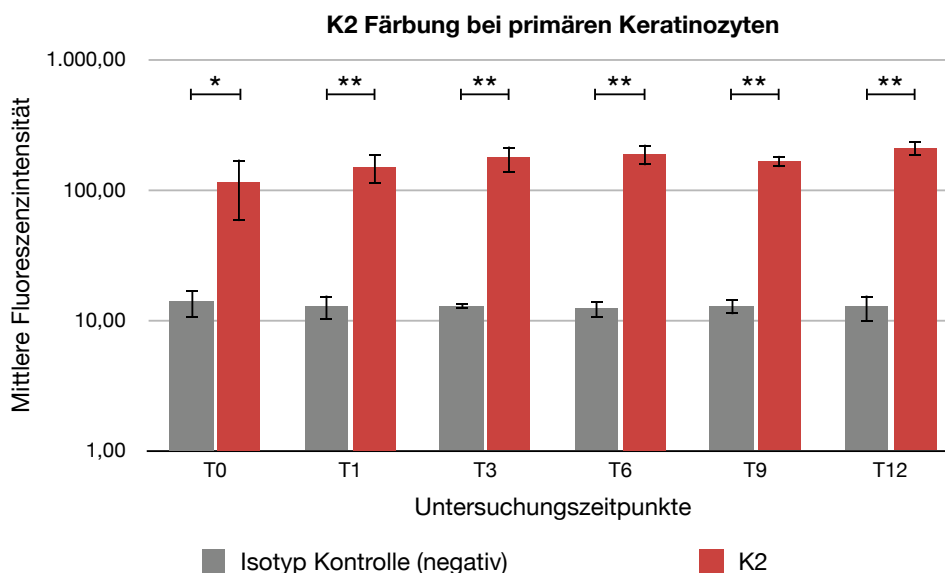


Abbildung 17: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 2 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

## Zytokeratin 10

Die MFI der PHGK mit Zytokeratin 10 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle, geringfügig größer. Die MFI zeigte im zeitlichen Verlauf eine geringen Schwankung ohne erkennbare zunehmende oder abnehmende Tendenz.

Tabelle 19: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 10-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	15,10	13,18	15,74	18,00	17,20	20,97
Versuch 2	PHGK	26,85	25,94	22,19	27,41	15,19	15,09
Versuch 3	PHGK	22,41	17,75	15,87	13,62	17,56	16,14
Mittelwert		21,45	18,96	17,93	19,68	16,65	17,40
Standardabweichung		5,93	6,47	3,69	7,05	1,28	3,14
p-Wert		0,062	0,122	0,064	0,114	0,016	0,174

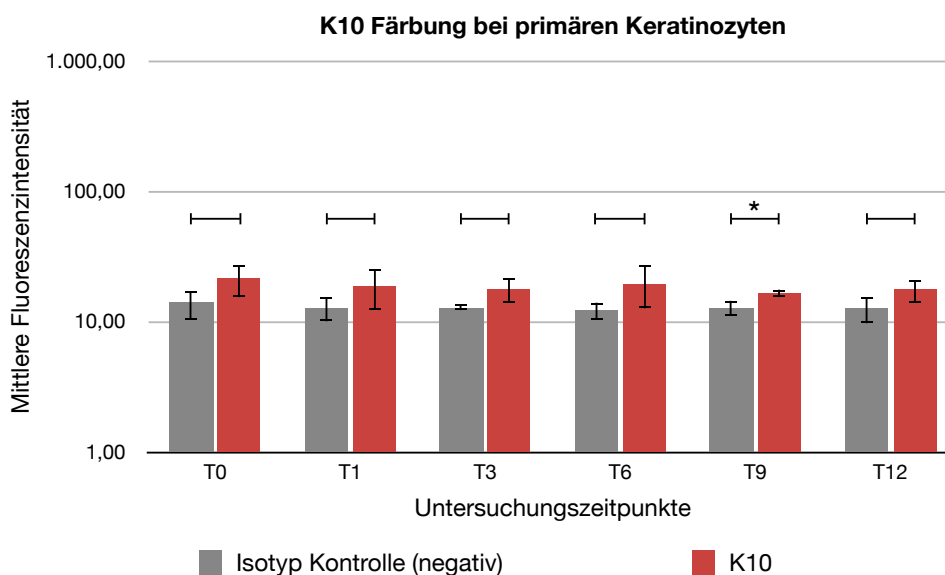


Abbildung 18: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 10 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

## Zytokeratin 14

Die MFI der PHGK mit Zytokeratin 14 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle geringfügig größer. Die MFI zeigte im zeitlichen Verlauf kleine Schwankungen ohne erkennbare zunehmende oder abnehmende Tendenz.

Tabelle 20: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 14-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	16,40	13,76	16,81	19,48	23,94	18,74
Versuch 2	PHGK	21,08	21,07	15,53	25,70	25,12	18,62
Versuch 3	PHGK	27,37	39,95	34,16	15,96	25,77	15,01
Mittelwert		21,62	24,93	22,17	20,38	24,94	17,46
Standardabweichung		5,50	13,51	10,41	4,93	0,93	2,12
p-Wert		0,051	0,156	0,182	0,039	0,000	0,117

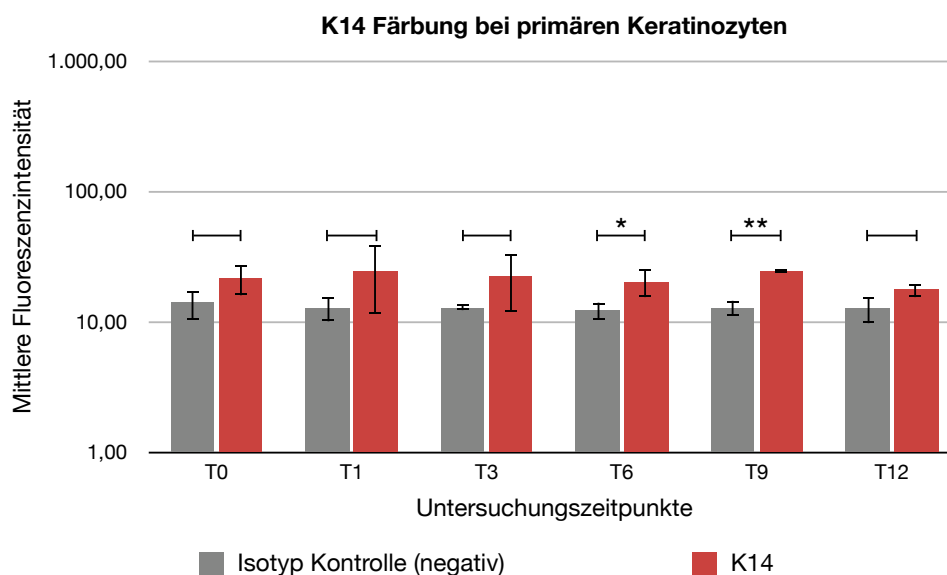


Abbildung 19: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 14 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

## Zytokeratin 17

Die MFI der PHGK mit Zytokeratin 17 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle geringfügig größer. Über den zeitlichen Verlauf zeigte sich eine geringe Schwankungsbreite ohne erkennbare abnehmende oder zunehmende Tendenz der MFI.

Tabelle 21: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 17-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	19,94	20,10	17,10	23,41	22,25	30,33
Versuch 2	PHGK	22,71	20,42	20,49	21,77	23,10	23,83
Versuch 3	PHGK	27,32	26,02	25,76	15,77	20,62	20,46
Mittelwert		23,32	22,18	21,12	20,32	21,99	24,87
Standardabweichung		3,73	3,33	4,36	4,02	1,26	5,02
p-Wert		0,014	0,011	0,027	0,024	0,001	0,026

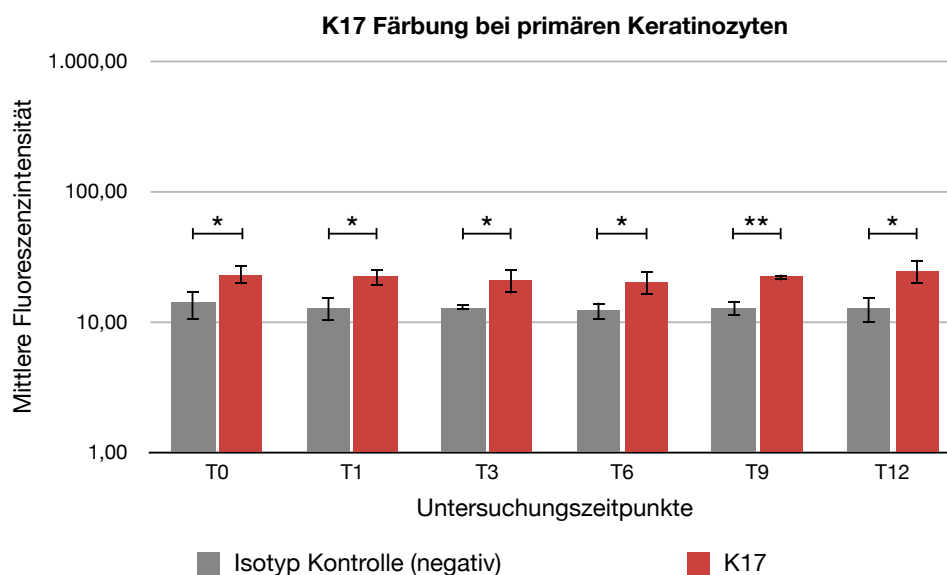


Abbildung 20: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 17 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

## Zytokeratin 18

Die MFI der PHGK mit Zytokeratin 18 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle größer. Die MFI nahm bis zum Zeitpunkt T6 zu, war zum Zeitpunkt T9 deutlich niedriger und zum Zeitpunkt T12 wieder auf dem Niveau von T1.

Tabelle 22: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 18-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	73,91	48,85	136,58	91,24	39,42	52,83
Versuch 2	PHGK	28,19	74,98	93,04	99,53	54,61	122,65
Versuch 3	PHGK	36,82	62,93	30,11	73,35	22,26	43,78
Mittelwert		46,31	62,25	86,58	88,04	38,76	73,09
Standardabweichung		24,29	13,08	53,53	13,38	16,18	43,16
p-Wert		0,069	0,003	0,075	0,001	0,046	0,075

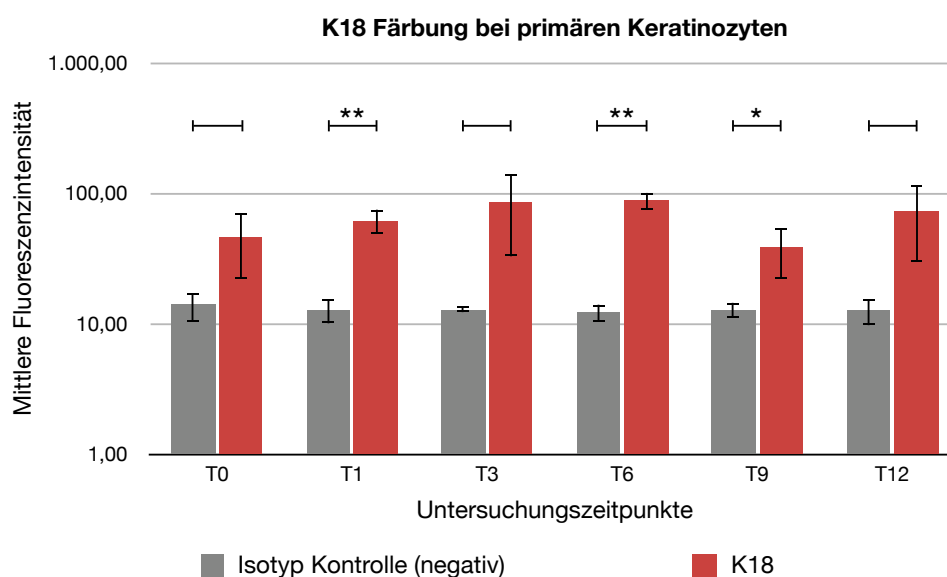


Abbildung 21: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 18 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

## Zytokeratin 19

Die MFI der PHGK mit Zytokeratin 19 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle deutlich größer. Im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte zeigte sich eine niedrige Schwankung der MFI ohne erkennbare abnehmende oder zunehmende Tendenz.

Tabelle 23: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Zytokeratin 19-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	89,05	69,89	90,05	127,58	125,57	165,08
Versuch 2	PHGK	193,57	179,65	175,30	173,27	164,34	195,30
Versuch 3	PHGK	126,91	125,61	120,19	96,81	98,47	121,74
Mittelwert		136,51	125,05	128,51	132,55	129,46	160,71
Standardabweichung		52,92	54,88	43,23	38,47	33,11	36,97
p-Wert		0,015	0,023	0,010	0,005	0,004	0,002

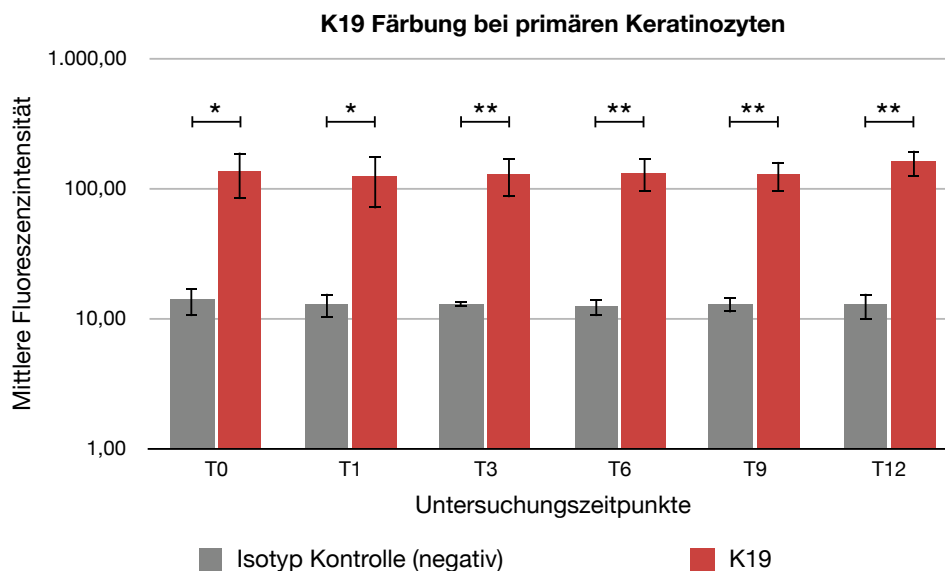


Abbildung 22: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 19 Antikörper**: Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

**Bax**

Die MFI der PHGK mit Bax Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle deutlich größer. Im Verlauf der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte zeigte sich eine geringe Schwankungsbreite mit einer Zunahme bis Zeitpunkt T3, einem Absinken an T6 und T9 und einem erneuten Anstieg an T12 auf das Niveau zum Zeitpunkt T3.

Tabelle 24: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Bax-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	74,96	92,20	158,03	147,02	120,92	163,40
Versuch 2	PHGK	90,08	151,12	176,00	203,16	160,69	202,11
Versuch 3	PHGK	154,71	204,94	181,12	147,45	172,82	170,82
Mittelwert		106,58	149,42	171,72	165,88	151,48	178,78
Standardabweichung		42,36	56,39	12,13	32,29	27,15	20,55
p-Wert		0,018	0,013	0,000	0,001	0,001	0,000

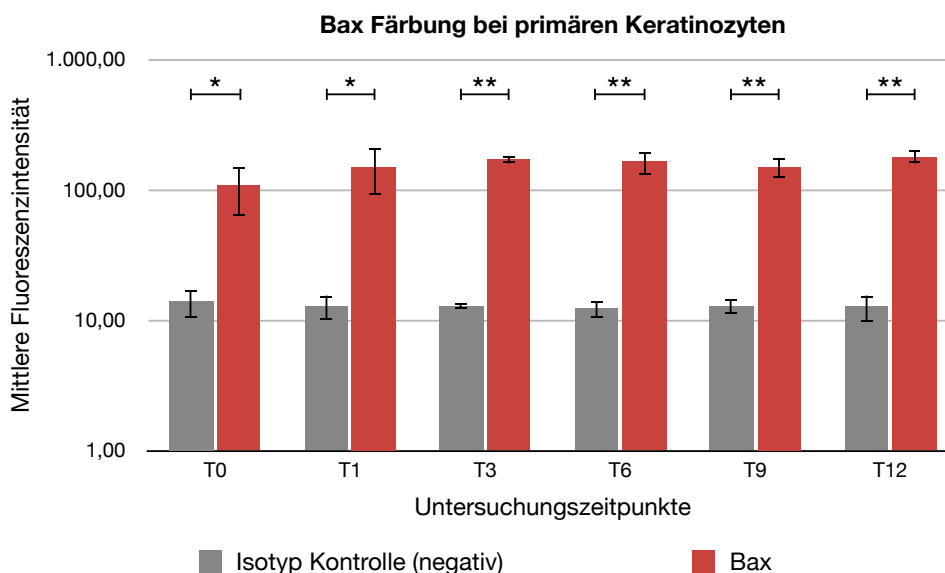


Abbildung 23: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Bax Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

**Bcl-x**

Die MFI der PHGK mit Bcl-x Immunfärbung war vergleichbar mit den Werten der Negativkontrolle.

Tabelle 25: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Bcl-x-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	15,59	12,45	11,07	13,75	14,18	18,79
Versuch 2	PHGK	17,16	14,59	13,31	15,91	14,35	23,41
Versuch 3	PHGK	24,61	16,82	15,93	14,97	15,49	15,53
Mittelwert		19,12	14,62	13,44	14,88	14,67	19,24
Standardabweichung		4,82	2,19	2,43	1,08	0,71	3,96
p-Wert		0,083	0,148	0,535	0,044	0,054	0,105

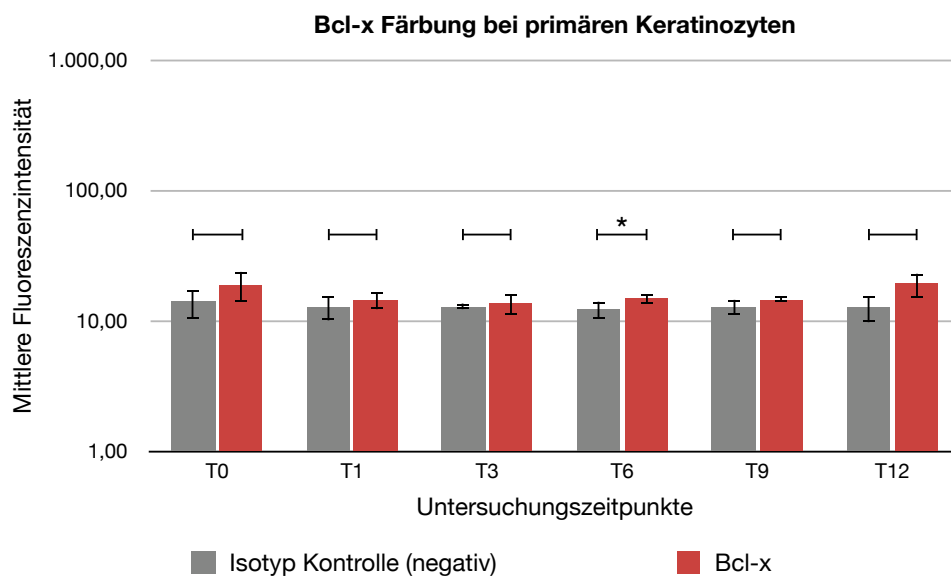


Abbildung 24: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Bcl-x Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01



## Caspase 14

Die MFI der PHGK mit Caspase 14 Immunfärbung war im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Negativkontrolle, deutlich größer. Im Verlauf der verschiedenen Differenzierungszeitpunkte zeigte sich eine geringe Schwankungsbreite der MFI ohne erkennbare abnehmende oder zunehmende Tendenz.

Tabelle 26: MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Caspase 14-Färbung

	Zelllinie	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Versuch 1	PHGK	354,46	403,59	574,25	571,61	536,82	752,28
Versuch 2	PHGK	453,72	484,54	547,75	540,90	561,28	577,40
Versuch 3	PHGK	471,32	522,60	346,76	445,00	519,17	486,85
Mittelwert		426,50	470,24	489,59	519,17	539,09	605,51
Standardabweichung		63,01	60,78	124,40	66,04	21,15	134,93
p-Wert		0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,002

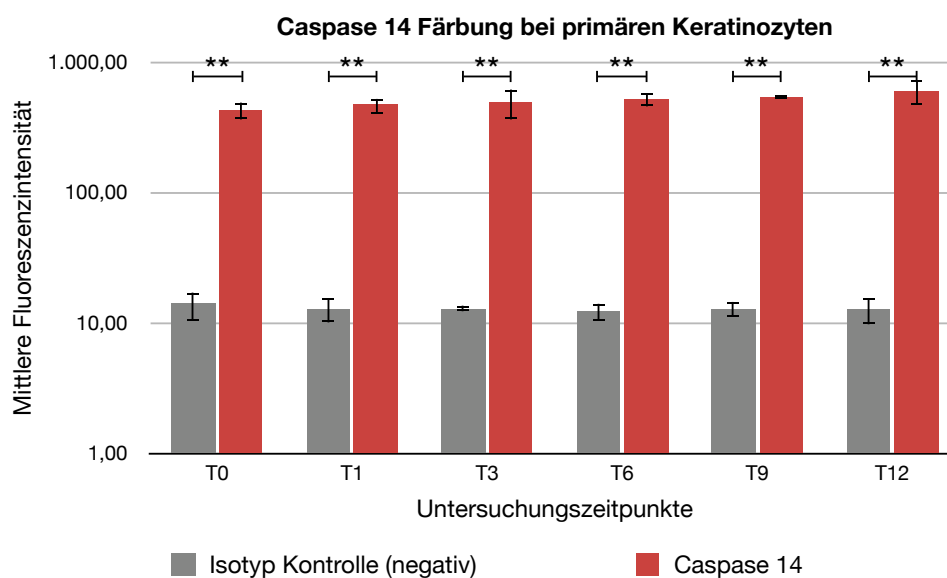


Abbildung 25: **MFI der PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Caspase 14 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der PHGK zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

### 7.1.3 Graphische Darstellung der Ergebnisse der IHGK und PHGK

Die p-Werte zu den folgenden Graphiken, sind im Anhang in Tabelle 33 hinterlegt.

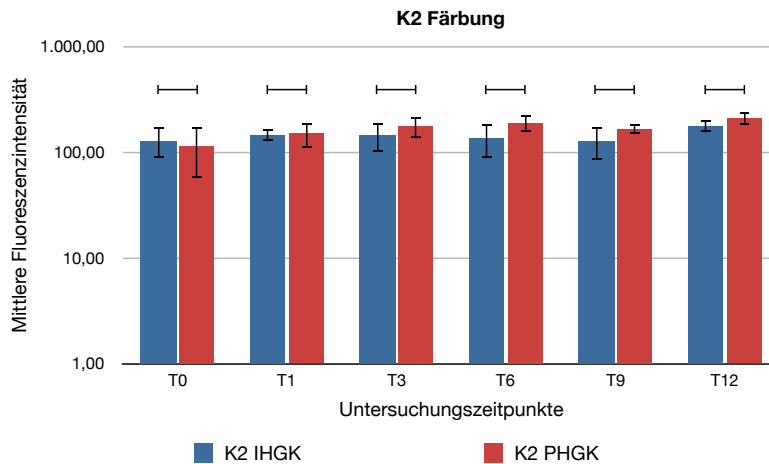


Abbildung 26: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 2 Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

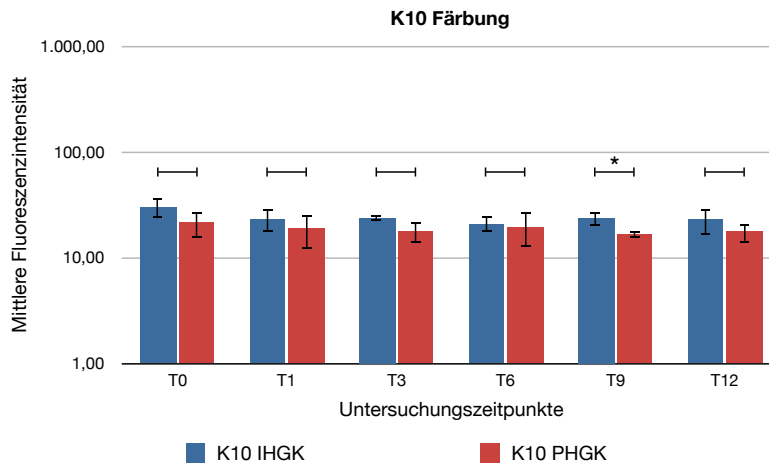


Abbildung 27: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 10 Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

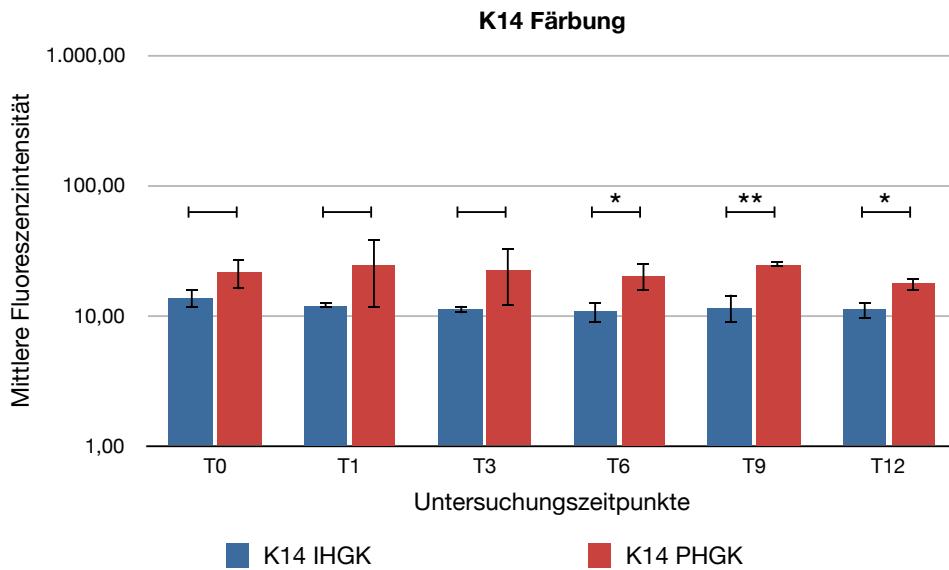


Abbildung 28: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 14 Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

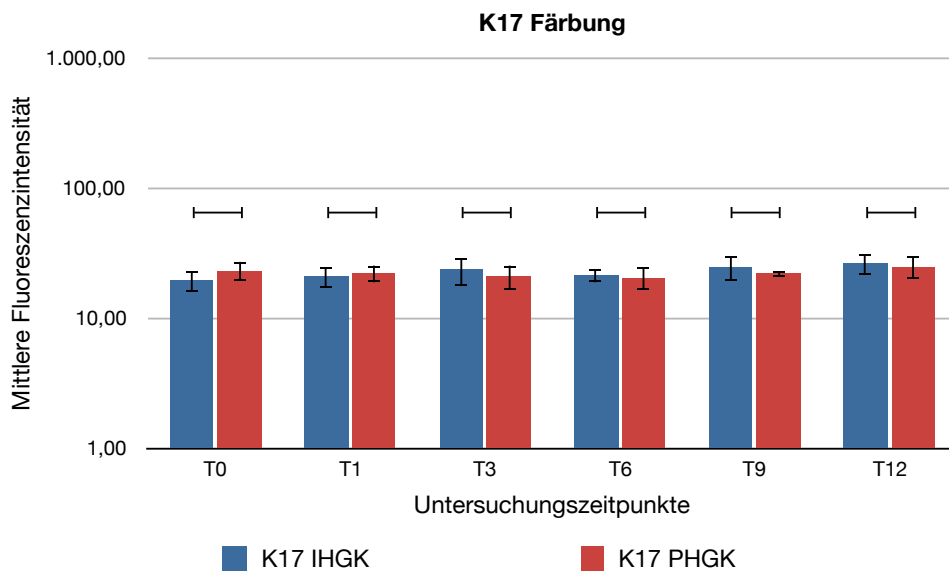


Abbildung 29: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 17 Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

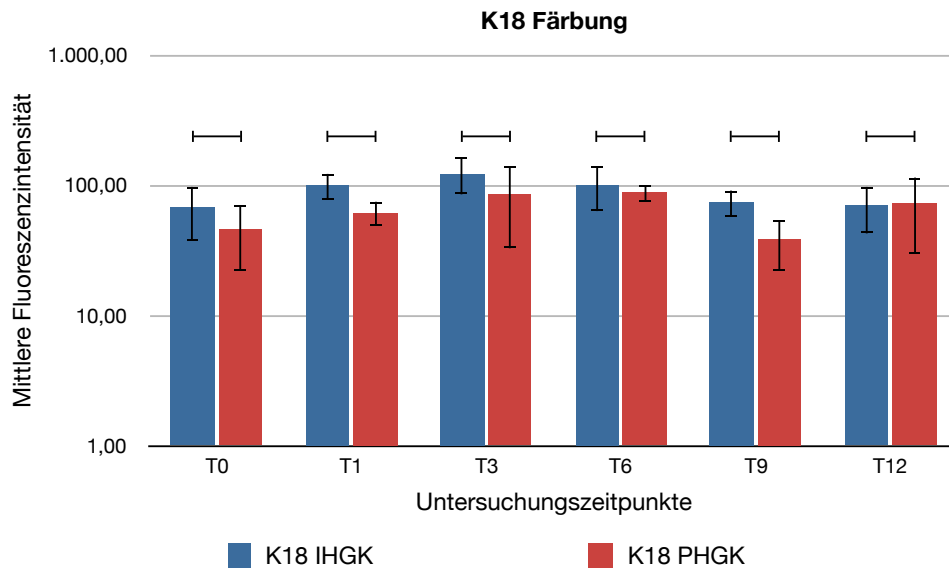


Abbildung 30: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 18 Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

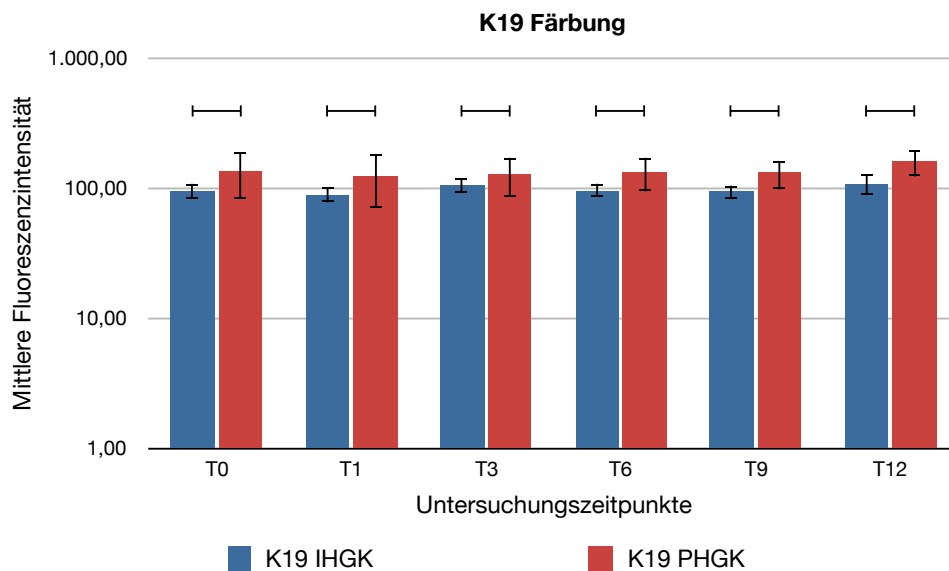


Abbildung 31: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Zytokeratin 19 Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

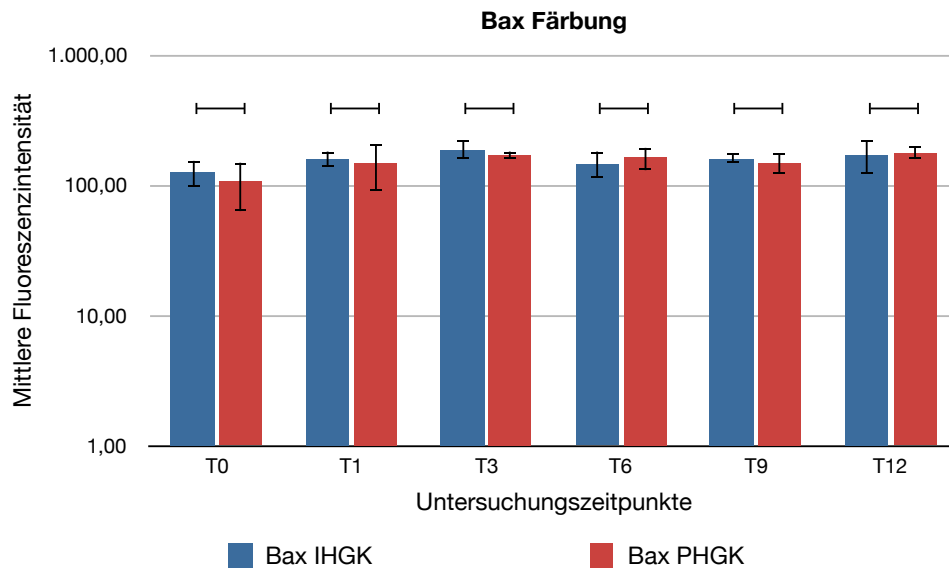


Abbildung 32: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Bax Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

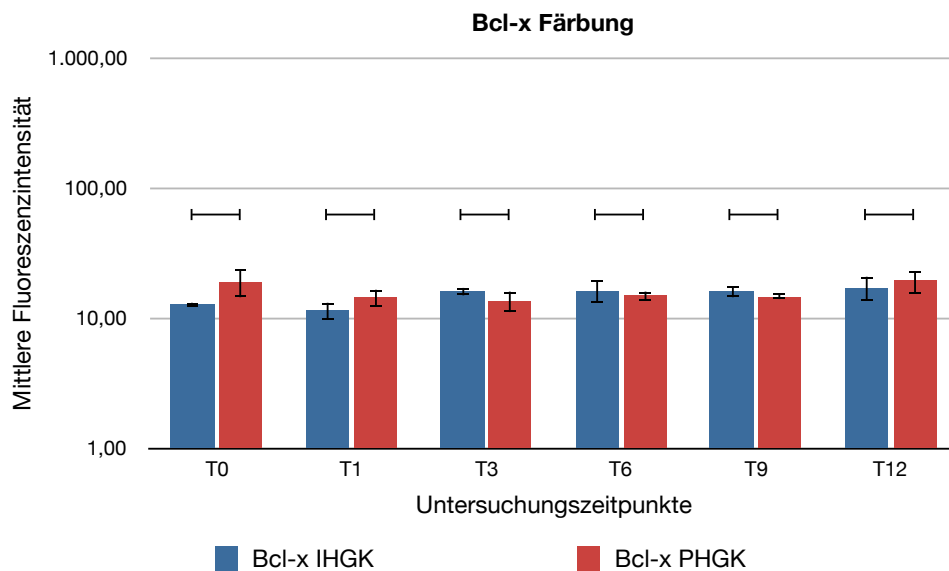


Abbildung 33: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Bcl-x Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

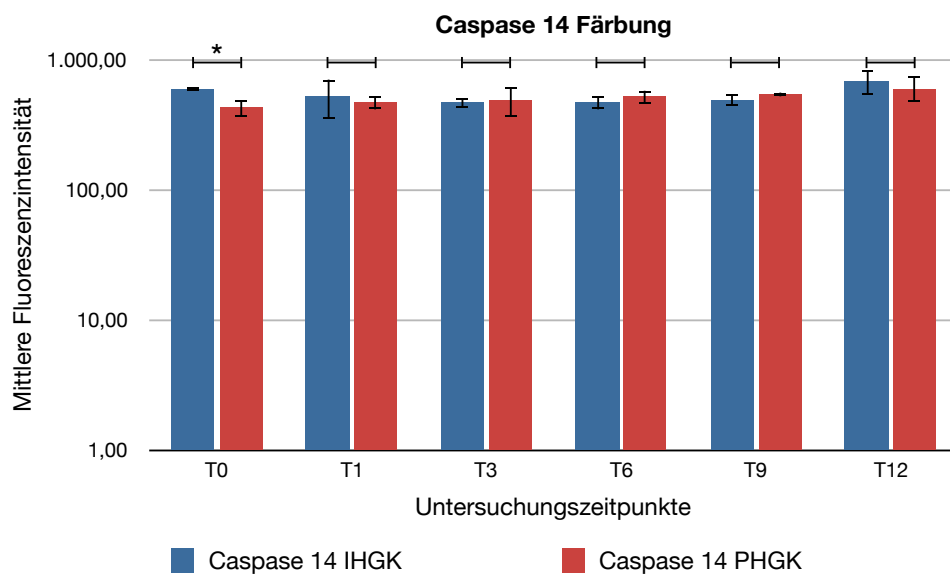


Abbildung 34: **MFI der IHGK und PHGK nach Aussaat in Zellkulturflaschen und Färbung mit Caspase 14 Antikörper:** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Zeitpunkten T0-T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

## 7.2 Aussaat auf Zellkultureinsätzen

### 7.2.1 Analyse immortalisierter humaner gingivaler Keratinozyten (IHGK) im Durchflusszytometer

#### Negativkontrolle

Die MFI der mit Isotyp-Kontrolle inkubierten IHGK war zu den verschiedenen Zeitpunkten annähernd konstant.

Tabelle 27: MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Isotyp-Färbung

	Zelllinie	T0	T3	T12
Versuch 1	IHGK	9,39	9,87	12,21
Versuch 2	IHGK	11,88	5,50	6,70
Versuch 3	IHGK	7,77	7,55	4,88
Mittelwert		9,68	7,64	7,93
Standardabweichung		2,07	2,19	3,82

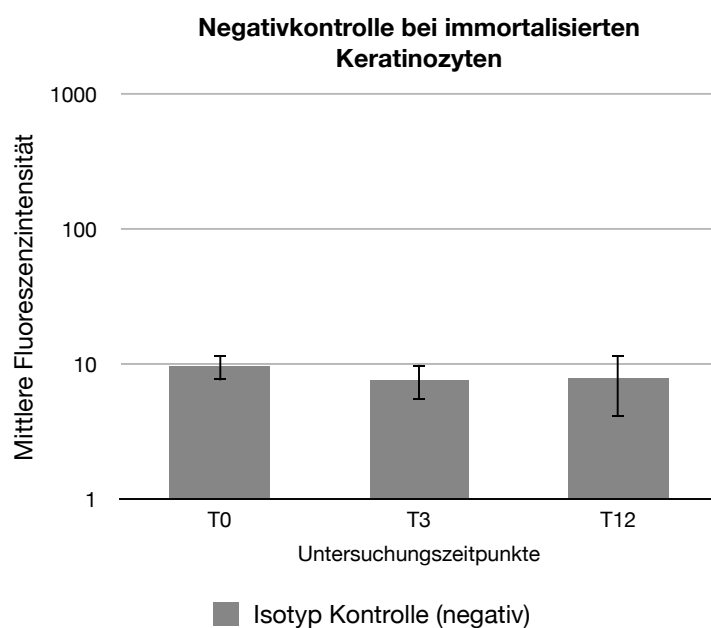


Abbildung 35: **MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Färbung mit Isotyp Kontrolle:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0, T3 und T12; n = 3

**Zytokeratin 10**

Die MFI der mit Zytokeratin 10 Antikörpern gefärbten IHGK entsprach annähernd den Werten der Negativkontrolle.

Tabelle 28: MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Zytokeratin 10-Färbung

	Zelllinie	T0	T3	T12
Versuch 1	IHGK	10,99	5,79	9,33
Versuch 2	IHGK	9,72	6,05	6,55
Versuch 3	IHGK	8,89	7,15	4,58
Mittelwert		9,87	6,33	6,82
Standardabweichung		1,06	0,72	2,39
p-Wert		0,896	0,380	0,691

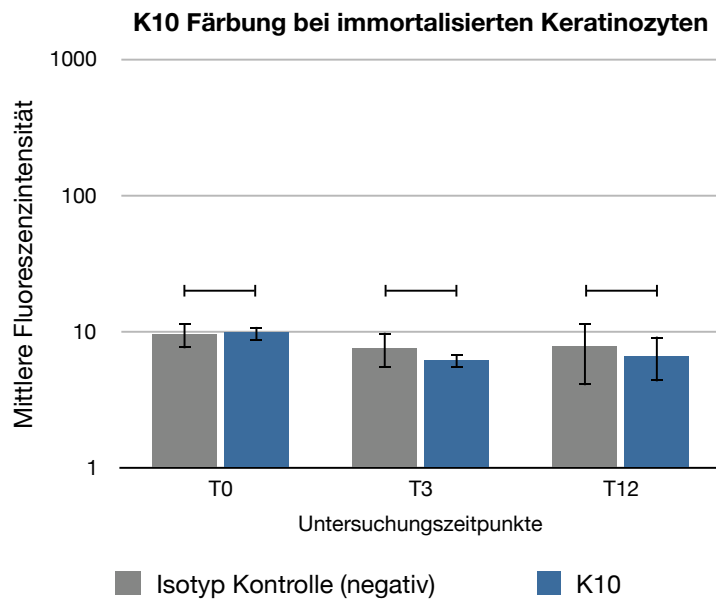


Abbildung 36: **MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Färbung mit Zytokeratin 10 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0, T3 und T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01



**Zytokeratin 14**

Die MFI der mit Zytokeratin 14 Antikörpern gefärbten IHGK war deutlich höher als die MFI der Negativkontrolle.

Tabelle 29: MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Zytokeratin 14-Färbung

	Zelllinie	T0	T3	T12
Versuch 1	IHGK	37,41	34,97	67,13
Versuch 2	IHGK	41,36	21,82	27,80
Versuch 3	IHGK	46,43	43,22	26,63
Mittelwert		41,73	33,34	40,52
Standardabweichung		4,52	10,79	23,05
p-Wert		0,000	0,016	0,073

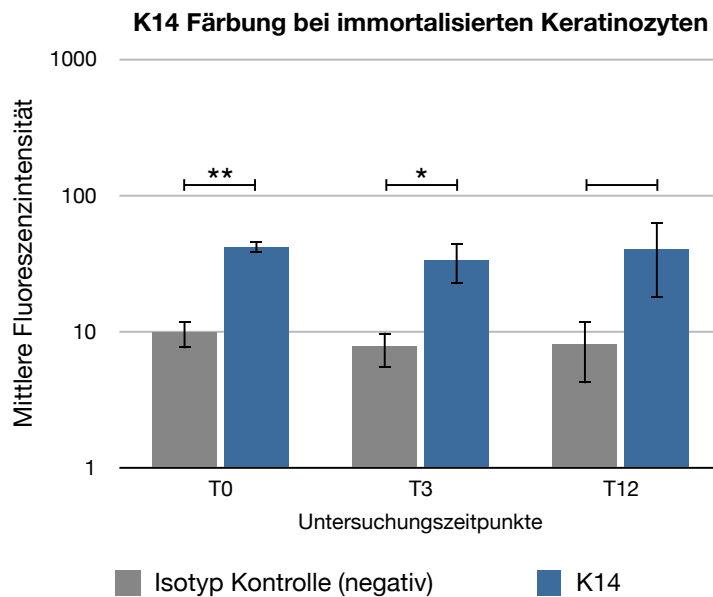


Abbildung 37: **MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Färbung mit Zytokeratin 14 Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0, T3 und T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

**Bax**

Die MFI der mit Bax Antikörpern gefärbten IHGK lag deutlich höher als die entsprechende MFI der Negativkontrolle. Zwischen den Zeitpunkten T0 und T3 war ein leichter Rückgang der MFI zu verzeichnen.

Tabelle 30: MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Bax-Färbung

	Zelllinie	T0	T3	T12
Versuch 1	IHGK	84,42	34,99	50,83
Versuch 2	IHGK	43,06	46,45	39,62
Versuch 3	IHGK	34,78	54,74	44,02
Mittelwert		54,087	45,39	44,83
Standardabweichung		26,59	9,92	5,65
p-Wert		0,045	0,003	0,001

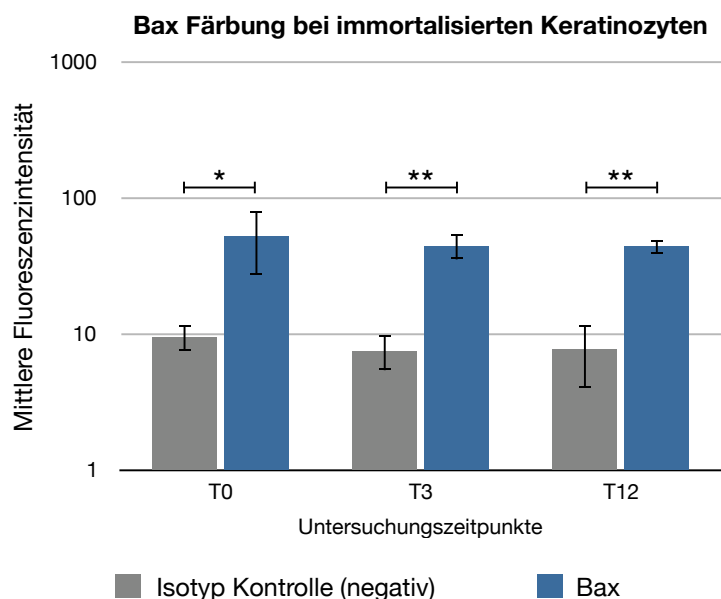


Abbildung 38: **MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Färbung mit Bax Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0, T3 und T12; n = 3; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

**Bcl-x**

Die MFI der mit Bcl-x Antikörpern gefärbten IHGK war zum Zeitpunkt T0 im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle schwach positiv. Die MFI zu den Zeitpunkten T3 und T12 entsprach den Werten der entsprechenden Negativkontrolle.

Tabelle 31: MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Bcl-x-Färbung

	Zelllinie	T0	T3	T12
Versuch 1	IHGK	12,13	6,42	7,13
Versuch 2	IHGK	17,74	7,79	9,21
Versuch 3	IHGK	8,57	8,59	6,46
Mittelwert		12,81	7,60	7,60
Standardabweichung		4,62	1,10	1,43
p-Wert		0,344	0,979	0,895

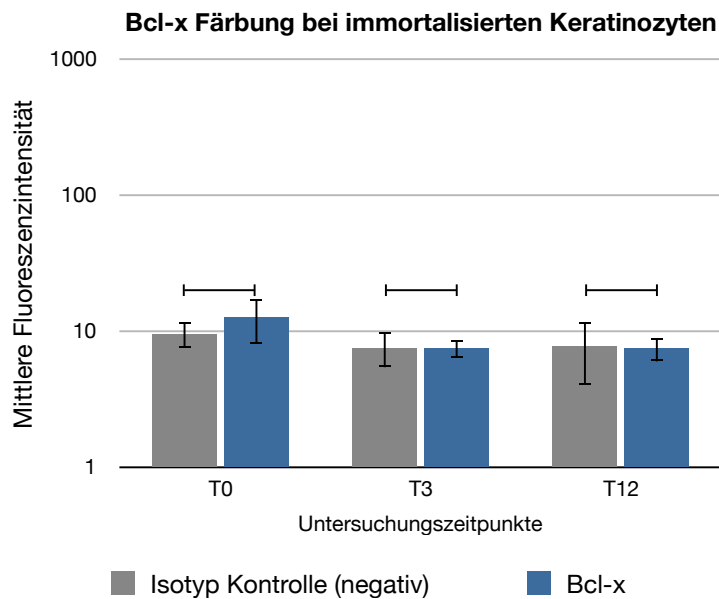


Abbildung 39: **MFI der IHGK nach Aussaat auf Zellkultureinsätzen und Färbung mit Bcl-x Antikörper:** Graphische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der IHGK zu den Zeitpunkten T0, T3 und T12; n = 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

### 7.2.2 TER-Berechnung

Der Anfangswert des TER lag bei den IHGK knapp unter  $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Der TER nahm mit Beginn der Differenzierung zum Zeitpunkt T1 hin stark zu. Zwischen T1 und T3 schwächte sich die Zunahme ab und der TER erreichte seinen Höchstwert an T3. Zu T4 hin nahm der Widerstand leicht ab und pendelte bis zum Zeitpunkt T12 um einen Wert von  $50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Die Standardabweichung war bei T0 gering und zu den Zeitpunkten T1 bis T12 bei Werten um  $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Die der Graphik zugrundeliegenden Werte sind im Anhang in Tabelle 34 hinterlegt.

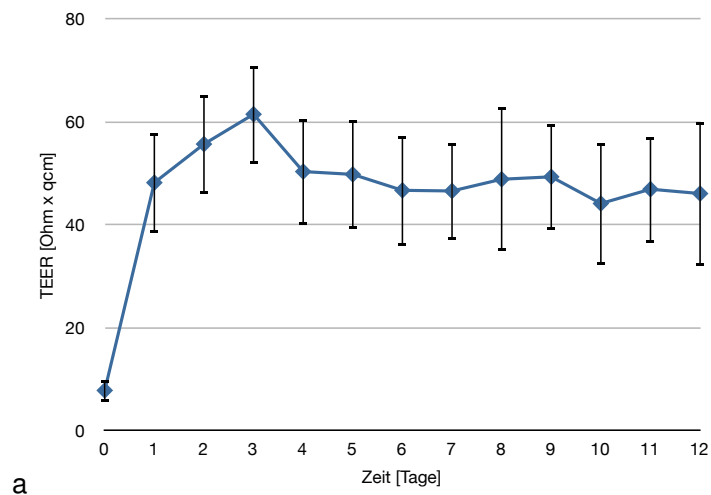


Abbildung 40: Graphische Darstellung des TER von IHGK über zwölf Tage. Angegeben ist der TER in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  und die Zeit in Tagen nach Beginn der Differenzierung.

## 8 Diskussion

### 8.1 Aussaat in Zellkulturflaschen

Ziel dieser Studie war es die Expressionsmuster verschiedener intrazellulärer Marker bei primären und immortalisierten humanen Keratinozyten *in vitro* zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Die MFI-Werte der Negativkontrolle waren innerhalb eines geringen Schwankungsbereiches konstant. Geringfügig kleinere Werte der PHGK und eine höhere Standardabweichung lassen sich darauf zurückführen, dass die drei verwendeten Zelllinien der PHGK nicht vom selben Spender abstammen und damit interindividuelle Unterschiede bestehen. Die verwendeten Zelllinien der IHGK stammten von einer Zelle ab und waren somit Klone. Im Vergleich zu den PHGK war eine geringere Streuung des Expressionsmusters zu erwarten. Entsprechend war bei den PHGK bei fast allen Antikörper-Färbungen eine höhere Standardabweichung zu beobachten.

Die MFI der Negativkontrolle ließ auf Grund ihrer niedrigen und konstanten Größe innerhalb eines Zelltyps, einen Vergleich der Expression anderer spezifischer Marker zu.

Folgende Vergleiche bezüglich der Expressionsstärke von Markern wurden vorgenommen

- Vergleich der Marker zur Negativkontrolle
- Vergleich zwischen verschiedenen Markern
- Vergleich der Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten
- Vergleich zwischen primären und immortalisierten Zellen

Grundsätzlich ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der gewählten Anzucht der Keratinozyten um eine submerse Methode handelt. Das bedeutet, dass die Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche fest angewachsen sind und zu jedem Zeitpunkt vom jeweiligen Nährmedium vollständig bedeckt sind. Untersuchungen zeigen, dass für eine histologisch nachweisbare Differenzierung mit

Bildung der verschiedenen Strata der Haut, eine Aussaat der Keratinozyten auf eine Trägermembran und eine spätere Anhebung dieser an die Luft-Flüssigkeitsgrenze notwendig ist (Gangatirkar et al. 2007). Untersuchungen mit gingivalen Keratinozyten auf Trägermembranen zeigten, dass submers angezüchtete Zellen eine schwache Differenzierung mit Stratifizierung und fehlenden Differenzierungsmarkern (K1, K10) vollziehen. An der Luft-Flüssigkeitsgrenze bilden die gingivalen Keratinozyten Differenzierungsmarker aus (Delcourt-Huard et al. 1997).

Keiner der verwendeten Marker zeigt eine deutlich zunehmende oder abnehmende Expression im Ablauf der sechs untersuchten Zeitpunkte. Eine gegenläufige Veränderung der Expressionsstärke wurde bei K10 und K14 erwartet, da dies für die basalen (K14) und suprabasalen Zellen (K10) Zellen jeweils typisch ist und ein bestimmtes Zellstadium im Verlaufe der Differenzierung anzeigt (Bragulla und Homberger 2009). Leichte Veränderungen in der Expressionsstärke sind bei den Markern K2, K18, Bax und Bcl-x zu erkennen.

Zytokeratin 10 wurde als wichtigstes Protein der Differenzierung mehrschichtiger Epithelien nur in geringen Mengen gebildet, alle anderen Differenzierungsmarker waren stark (K2) und sehr stark (Caspase14) exprimiert. Die Apoptosemarker Bax und Bcl-x zeigten eine leichte Veränderung der Expression. Die Expression von Bax nahm bei PHGK und IHGK von einem hohen Wert ausgehend bis T3 zu und blieb bis T12 konstant. Die Bcl-x Expression der IHGK nahm von einem negativen Wert bis zum Zeitpunkt T3 zu und blieb bis T12 schwach positiv, bei den PHGK war sie an T0 und T12 schwach positiv. Dies deutet auf eine geringe Differenzierung der IHGK hin. Eine Differenzierung der PHGK ist auf Grund der heterogenen Expression des Bcl-x nicht eindeutig, durch die Zunahme der Werte für Bax aber nicht auszuschließen. Demgegenüber stehen die Proliferationsmarker K14, K17, K18 und K19, welche ein heterogenes Bild zeigten. Die Zytokeratine 14 und 17 wurden nur schwach gebildet und K18 und K19, als Marker für wenig differenzierte Zellen einfacher Epithelien, wurden deutlich exprimiert.

Zytokeratin 2 wird *in vivo* ausschließlich suprabasal im Stratum spinosum zu einem späteren Zeitpunkt als K10 gebildet (Collin et al. 1992; Bragulla und Homberger 2009). Daher war die Erwartung, dass K2 nach einer anfänglichen schwachen Expression nach einigen Tagen vermehrt ex-

primiert wird. Dies lässt sich bei den PHGK nachvollziehen, deren Expressionsstärke von einem hohen Wert ausgehend bis T3 leicht zunahm und bis T12 auf diesem Werte stabil blieb. Orientiert man sich an der *in vivo* Situation, wären größere Veränderungen zu erwarten gewesen (Bloor et al. 2003). Die IHGK zeigten kaum Veränderungen der Expressionsstärke für K2.

Die Expression des Zytokeratins 2 lässt die Annahme zu, dass die Keratinozyten sich bereits an T0 in einem fortgeschrittenen Differenzierungszustand befinden. Dies steht jedoch im Gegensatz zur Expression des Zytokeratins 10, das ein wichtiger Differenzierungsmarker ist und in den vorliegenden Untersuchungen nur schwach exprimiert wurde. Eine mögliche Ursache der deutlichen K2 Expression sind starke Zell-Zell-Kontakte, die bei konfluenter Anzucht der Zellen entstehen und die Differenzierung einleiten oder beschleunigen können (Pillai et al. 1990). Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90% gesplittet oder mit Differenzierungsmedium weiterkultiviert. Bloor et al. untersuchten primäre, epidermale Keratinozyten, die bis zu einer Konfluenz von 90% in Zellkulturflaschen gezüchtet wurden. Die Expression von K2, K10, K14 wurde im Western Blot untersucht. K14 als Marker für undifferenzierte Keratinozyten war positiv, K2 und K10 als Differenzierungsmarker negativ (Bloor et al. 2003). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Differenzierung durch zu hohe Konfluenz.

Einen anderen Ansatz zur Erklärung der Diskrepanz zwischen der Expression der Differenzierungsmarker K2 und K10 geben Garzón et al. (2009). In dieser Studie wurden humane Gingivabiopsate für die Zellkultur präpariert. Die gewonnenen Keratinozyten wurden auf Zellkultureinsätzen angezüchtet und mit Fibroblasten kokultiviert. Nach dem Anwachsen der Keratinozyten wurden sie an die Luft-Flüssigkeitsgrenze gehoben und dort weiterkultiviert. Schließlich wurden die angezüchteten Zellen auf athymische Mäuse transplantiert. Die Analyse der Zellen und Gewebe ergab, dass die Zytokeratin Expression der humanen Kontroll-Biopsie mit der Expression, der in Zellkultur hergestellten und transplantierten Haut, übereinstimmte. Die Untersuchung der Keratinozyten auf den Zellkultureinsätzen ergab, dass die Zytokeratine K7, K8, K18, K19 exprimiert wurden. Die Analyse der Kontrolle und des Transplantats zeigte, dass diese Marker nicht exprimiert wurden. Vergleichbare Ergebnisse lagen für K10, das in der Kontrolle und dem Transplantat nachweisbar war, nicht aber *in vitro* (Garzón et al. 2009). Die Hypothese der Autoren besagt, dass fehlende

Stimuli wie Sauerstoffmangel und eine geringe Verfügbarkeit von Nährstoffen die Ursache für die veränderte Zytokeratin Expression *in vitro* sind und dass die Zellen eine Weiterentwicklung im Sinne einer Differenzierung vollziehen, aber die Eigenschaften einfacher Epithelien behalten, die mit der Expression entsprechender Marker (K18, K19) einhergeht. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den vorliegenden Untersuchungen, so zeigt sich ein sehr ähnliches Bild. Die Marker, die in beiden Studien untersucht wurden (K10, K18, K19), verhalten sich unter Zellkulturbedingungen vergleichbar. Bei den Versuchen von Garzón et al. handelt es sich um ein mehrschichtiges, an der Luft-Flüssigkeitsgrenze differenziertes Epithel. Die Expression von K18 und K19 kommt in allen Schichten des Epithels vor.

Zytokeratin 14 zeigte von allen untersuchten Markern das heterogenste Expressionsmuster. IHGK zeigten keine Expression von K14. PHGK zeigten insgesamt eine geringe Expression. Wetzels et al. untersuchten die Reaktivität des hier verwendeten Zytokeratin 14 Antikörpers (Klon RCK107) mit dem Zytokeratin 14 Protein und zeigten, dass es nur mit einem Epitop des Zytokeratin 14 reagierte (Wetzels et al. 1991). Sie konnten ebenfalls zeigen, dass es in Epithelien verschiedener Organe wie Ösophagus, Larynx und Epidermis in den Basalzellen nachweisbar ist.

In einer Studie von Coulombe et al. zeigte sich in immunelektronenmikroskopischen Bildern eine geringere K14 Expression als erwartet (Coulombe et al. 1989). Die Autoren erklärten diesen Effekt mit einer Maskierung der Antigene der Zytokeratine, sodass die Antikörper nicht binden konnten. Auch Byrne et al. berichten, dass Zytokeratine dazu neigen Kreuzreaktionen auszubilden und sich der Antikörperfärbung durch Antigenmaskierung zu entziehen (Byrne et al. 1994). Zytokeratine gelten als sehr stabile Proteine, da sie neben einem komplexen Aufbau in der Tertiärstruktur zahlreiche Disulfidbrücken aufweisen, die einen Abbau des Proteins erschweren (Scott und Untereiner 2004).

Zytokeratin 14 ist für die Analyse differenzierender Epithelien sehr wichtig, da es nur in den basalen Zellschichten vorkommt und so eine eindeutige Identifizierung der undifferenzierten Zellen des Stratum basale ermöglicht. Für weitere Untersuchungen kann ergänzend oder an Stelle des Zytokeratin 14 Antikörpers eine Zytokeratin 5 Färbung vorgenommen werden. Zytokeratin 5 ist der Partner des Zytokeratin 14 und wird ebenfalls in den basalen Zellschichten gebildet (Bragulla und



Homberger 2009). So lässt sich eine mögliche heterogene Färbung des Zytokeratin 14 umgehen, ohne dass auf die wichtige Färbung des Stratum basale verzichtet werden muss.

Zytokeratin 17 wird in Zellen, die einen geringen Grad an Differenzierung und hohe Proliferation zeigen, gebildet. In oralen Plattenepithelkarzinomen wird es in den basalen Schichten initialer Läsionen und in den suprabasalen Schichten fortgeschrittener Läsionen gebildet (Lalli et al. 2008). In hyperproliferierenden, suprabasalen Zellschichten psoriatischer Läsionen ist es ebenfalls nachweisbar (Leigh et al. 1995). Mehrschichtige, verhornende Epithelien bilden unter physiologischen Verhältnissen kein Zytokeratin 17 (Wei et al. 2009). Die leichte Expression von Zytokeratin 17 in den vorliegenden Untersuchungen könnte darauf hindeuten, dass die Zellen sich eher in einem Zustand geringer Differenzierung befinden. Vergleicht man das Auftreten des Zytokeratin 17 *in vivo* mit den vorliegenden Ergebnissen, ist von einer unspezifischen Differenzierung der Zellen im Sinne einer neoplastischen Zellentwicklung (Lalli et al. 2008) auszugehen oder von einer Fehlfunktion der Keratinozytenregulierung wie bei Psoriasis vulgaris (Leigh et al. 1995), die sich in dem Fehlen des Stratum granulosum äußert.

Der gewählte Antikörper zur Detektion des Bcl-xL Proteins ist spezifisch für Bcl-x. Damit ist eine Unterscheidung zwischen der langen, antiapoptotischen und der kurzen proapoptotischen Form des Bcl-x Moleküls nicht möglich. Krajewski et al. konnten anhand von Immunoblot-Analysen nachweisen, dass Bcl-xS *in vivo* nur sehr schwach und unregelmäßig gebildet wird und möglicherweise die Ursache proteolytischer Vorgänge ist. Die vorherrschende Variante *in vivo* ist das Bcl-xL (Krajewski et al. 1994b). Des Weiteren konnten Wrono-Smith et al. zeigen, dass Bcl-xS von Keratinozyten unter Zellkulturbedingungen nicht gebildet wird (Wrono-Smith et al. 1995). Damit ist davon auszugehen, dass eine positive Färbung von Bcl-x, einer Bcl-xL Expression entspricht (Tan und Lee 2009).

In einer Studie von Thomková et al. wurde die Bax und Bcl-x Expression an Keratinozyten mittels Western Blot untersucht. Die Zellen wurden für zehn Tage in einem Medium mit niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt kultiviert, das außerdem all-trans-Retinol enthielt (Thomková et al. 1999). Die Expression der beiden Proteine nahm innerhalb der ersten zwei Tage zu und blieb danach bei Bax auf einem hohen, bei Bcl-xL auf einem niedrigen Niveau konstant. Abgesehen von der initialen Zunahme von

Bax und Bcl-xL, die in den vorliegenden Untersuchungen nur gering nachweisbar war, stimmt die Expression der Marker aus der Studie von Thomková mit den hier erhaltenen Ergebnissen überein.

Die Zunahme der Bax und Bcl-xL Expression in der Studie von Thomková et al. wird darauf zurückgeführt, dass Retinol in Keratinozyten die Expression von Genen, die Einfluss auf die Apoptose nehmen, verändert (Lee et al. 2009). Über den Einfluss des Retinols gibt es widersprüchliche Ergebnisse. So zeigten Eichner und Lee et al. bei der Kultivierung von Keratinozyten, dass Retinolsäure und Retinoide die Proliferation steigern und die Differenzierung unterdrücken (Eichner 1986; Lee et al. 2009). Altucci und Gronemeyer hingegen wiesen nach, dass Retinolsäure Tumorzellen in die Apoptose und Differenzierung treibt (Altucci und Gronemeyer 2001). Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Wirkungsweisen konnten Schug et al. geben, die zwei Signalwege der Retinolsäure beschrieben. Eine Aktivierung des Retinolsäure Rezeptors (RAR) führte zu Apoptose und Wachstumsinhibition, die Aktivierung des PPA Rezeptors  $\beta/\delta$  (peroxisome proliferator-activated receptor) zur Proliferation von HaCaT-Keratinozyten (Schug et al. 2007). Das bedeutet für die vorliegenden Untersuchungen in Bezug auf Bax und Bcl-xL, dass die Keratinozyten sich in einem Stadium geringer Differenzierung befinden, da eine schwache Bcl-xL Expression *in vivo* in proliferierenden oder gering differenzierten Zellen nachweisbar ist.

Rendl et al. untersuchten die Caspase 14 Expression *in vitro* in organotypischen Kulturen über fünf Tage bei Keratinozyten, die durch Retinol in einem proliferierenden Zustand gehalten wurden, ebenso bei Keratinozyten die durch postkonfluente Anzucht in die Differenzierung getrieben wurden. Die proliferierenden Zellen zeigten in beiden Versuchen nach vier Tagen eine kaum nachweisbare Caspase 14 Expression. Die differenzierenden Zellen exprimierten nach einem Tag im postkonfluenten Zustand eine höhere Menge an Caspase 14, die bei zunehmender Differenzierungsdauer weiter anstieg (Rendl et al. 2002). Damit wurde die Studie von Lippens et al. bestätigt, die *in vitro* bei undifferenzierten Zellen keine Caspase 14 nachweisen konnte. Im postkonfluenten Zustand der Kulturen, bildeten die Keratinozyten Caspase 14 (Lippens et al. 2000). Dies entspricht dem Nachweis der Caspase 14 *in vivo* in den suprabasalen Schichten (Denecker et al. 2008). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den vorliegenden Untersuchungen zeigt, dass die PHGK und

IHGK schon zu Beginn der Anzucht einen hohen Differenzierungsgrad haben und die Caspase 14 Expression zu den verschiedenen Anzuchtzeitpunkten kaum Veränderungen aufweist.

Im Labor kultivierte Zellen verändern mit steigender Passagenzahl ihre Zellaktivität. Die Teilungsfähigkeit fällt nach einer gewissen Zeit rasch ab (Hayflick-Phänomen) und die Proteinexpression und Morphologie der Zellen verändert sich (Hayflick und Moorhead 1961; Norsgaard et al. 1996). Um diese Veränderung gering zu halten, wurden für die Untersuchungen PHGK mit maximal fünf Passagen gewählt. Die IHGK, die durch die virale Transfizierung immortalisiert wurden, wurden in einer höheren Passagenzahl *in vitro* eingesetzt. Unter den gewählten Bedingungen weisen PHGK mit einer geringen Passagenzahl und IHGK mit einer höheren Passagenzahl ein nahezu identisches Expressionmuster der untersuchten Marker auf. Hinweise auf Unterschiede waren bei der Zytokeratin 14 Expression zu beobachten. So zeigten PHGK mit zunehmender Inkubationszeit eine statistisch signifikant höhere Expression von Zytokeratin 14 als IHGK. Zur eingehenden Charakterisierung der IHGK sind weitere Untersuchungen notwendig, die den Zellzyklus, die Morphologie und die Proteinexpression über eine höhere Passagenzahl und den Verlauf der Lebensdauer der PHGK dokumentieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine klare Korrelation der Expressionsmuster zwischen den im Zellkulturlabor angezüchteten Zellen und Zellen im natürlichen Zellverband feststellbar war. Mit den angewandten Methoden zeigte sich keine eindeutige Differenzierung der Zellen im zeitlichen Verlauf, sondern ein stabiles Expressionsmuster der untersuchten Marker. Versucht man die Zellen einem bestimmten Entwicklungszustand zuzuordnen, lässt sich das Expressionsmuster als Ausdruck differenzierter Keratinozyten mit Kennzeichen eines einfachen Epithels, interpretieren. Zwischen den beiden Zellarten PHGK und IHGK bestehen keine grundsätzlichen Unterschiede bezüglich der Expressionsmuster der untersuchten Marker. Eine geringe Abweichung ist bei der Expression des Zytokeratin 14 nachweisbar, die bei den PHGK schwach ausgeprägt ist und bei den IHGK fehlt. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse frühere Untersuchungen, die keine entscheidenden Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen zeigten (Gröger et al. 2008).

### 8.2 Aussaat auf Zellkultureinsätzen

Die Analyse der Keratinozyten, die auf Zellkultureinsätzen ausgesät wurden, sollte klären, ob es Hinweise darauf gibt, dass die Zellen durch Veränderung des Anzuchtsuntergrundes ihr Expressionsverhalten für Zytokeratine verändern. Da die Versuche mit den in Zellkulturflaschen angezüchteten Zellen, keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen primären und immortalisierten humanen Keratinozyten zeigten, wurden in dem weiterführenden Versuch nur IHGK untersucht. Die Untersuchungszeitpunkte wurden auf T0, T3 und T12 beschränkt, da sich im zeitlichen Verlauf des Hauptversuches kaum Veränderungen zeigten. Untersucht wurden die vier wichtigsten Differenzierungsmarker, die im Hauptversuch zur Anwendung kamen.

Die Werte der Negativkontrolle in den vorliegenden Untersuchungen sind geringfügig schwächer als die entsprechenden Werte des Hauptversuches. Die Ergebnisse der Versuchsansätze in Zellkulturflaschen und auf Zellkultureinsätzen sind miteinander vergleichbar, da die jeweiligen Negativkontrollen eine ähnlich starke Expression haben. Die im Vergleich zum Hauptversuch höhere Schwankungsbreite der Werte lässt sich damit erklären, dass die Zellen für einen Versuch in mehrere voneinander getrennte wells aufgeteilt angezüchtet werden mussten.

Wie auch im vorherigen Versuch, ist bei der submersen Anzucht von Keratinozyten auf Zellkultureinsätzen keine vollständige Differenzierung zu erwarten. Die gewählten Zelleinsätze ermöglichten durch die Beschichtung der PTFE-Membran mit Kollagen Typ I und III die Simulierung einer Basalmembran. Die natürliche Basalmembran setzt sich zum großen Anteil aus Kollagen Typ IV zusammen. Villars et al. konnten zeigen, dass Endothelzellen, welche auf Zellkultureinsätzen mit Kollagen Typ I und III Beschichtung angezüchtet wurden, ein ähnliches Anzuchts- und Proliferationsverhalten aufwiesen wie auf Membranen mit Kollagen IV Beschichtung (Villars et al. 1996). In einem anderen Versuch von Hawley-Nelson et al. hatten humane Keratinozyten, die auf einer Kollagen I und III beschichteten Kunststoffbasis angezüchtet wurden, eine deutlich höhere Adhäsion, Koloniebildung und Proliferation als Keratinozyten, die in unbehandelten Zellkulturflaschen angezüchtet wurden (Hawley-Nelson et al. 1980). Es konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten auf den gewählten Zellkultureinsätzen ein gutes Anzuchts- und Differenzierungsverhalten entwickeln

können (Papaioannou et al. 1999; Gröger et al. 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass sich die Keratinozyten in einem proliferierenden Zustand befinden. Die Umstellung auf ein  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -haltiges Differenzierungsmedium nach dem Zeitpunkt T0, führt nicht zu einer Änderung des Differenzierungsverhaltens der Keratinozyten in Bezug auf die untersuchten Marker. Das basale Zytokeratin 14 ist deutlich positiv, das suprabasale Zytokeratin 10 wird nicht exprimiert. Die Expression von Bax, das in der Differenzierung in allen Zellschichten gebildet wird und Bcl-x, das *in vivo* suprabasal gebildet wird, entspricht dem Expressionsverhalten basaler, undifferenzierter Keratinozyten *in vivo*.

Die Ergebnisse sind homogen, beinhalten aber im Vergleich zum Hauptversuch, nur ein kleines Spektrum der Zellanalyse. Sie können einen Hinweis auf das Differenzierungsverhalten der Keratinozyten geben. Die Färbung für K14, die mitunter heterogene Ergebnisse bringt, wurde bereits unter 8.1 diskutiert und sollte in weiterführenden Untersuchungen durch Färbung mit anderen Proliferationsmarkern wie K5 ergänzt werden.

Papaioannou et al. untersuchten *in vitro* die Histologie und Zytokeratinexpression von Mundschleimhautzellen, die aus gingivalem Taschen- und Saumepithel stammten. Die Keratinozyten wurden von drei Patienten nach parodontalchirurgischen Eingriffen gewonnen und *in vitro* angezchtet. Nach ausreichender Proliferation wurden die Zellen in Passage 2 auf kollagenbeschichtete Zellkultureinsätze ausgesät und für 1, 2 und 3 Wochen mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und FCS-haltigem Differenzierungsmedium submers kultiviert. Die histologische Analyse ergab ein mehrschichtiges Epithel mit drei bis fünf Zelllagen. Die Immunfärbung an Kryoschnitten zeigte für K10 eine negative und für K14 eine positive Expression. Papaioannou et al. interpretierten die *in vitro* Ergebnisse als Epithel mit Ähnlichkeit zum Taschen- und Saumepithel, da die Immunfärbung für K18 und K19, als Marker für einfache Epithelien, deutlich positiv war (Papaioannou et al. 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung entsprechen in Bezug auf die K10 und K14 Expression denen von Papaioannou et al. Die geringe Differenzierung, die auch von Papaioannou et al. beobachtet wurde, führen die Autoren auf die submerse Anzucht zurück. Nach der Hypothese der Autoren bewirkt ein

Anheben der Zellen an die Luft-Flüssigkeitsgrenze die Ausbildung von Differenzierungsmerkmalen.

Gröger et al. konnten mit Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) eine beginnende Differenzierung der Keratinozyten auf Zellkultureinsätzen zeigen. Es wurde gezeigt, dass bei humanen gingivalen Keratinozyten die Umstellung auf ein  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  haltiges Differenzierungsmedium eine deutliche Erhöhung des TER hervorrief (Gröger et al. 2010; Meyle et al. 1999). Die Zunahme des TER steht im Zusammenhang mit der Ausbildung der parazellulären Verschlussbarriere, die sich aus tight junctions zusammensetzt (Meyle et al. 1999; Lüllmann-Rauch 2003). Tight junctions tragen zur Regulierung der Proliferation, Differenzierung und Polarisation der Zellen bei und wirken über verschiedenen Signalwege antiproliferativ (Matter et al. 2005). Eine Zunahme des TER geht daher mit einer vermehrten Neigung zur Differenzierung einher. Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten die Ergebnisse von Gröger et al. bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen darauf hindeuten, dass die Umstellung auf das Differenzierungsmedium zu einer geringen Veränderung der Expression der untersuchten intrazellulären Marker führt. Es ist die Ausbildung einer parazellulären Verschlussbarriere festzustellen, die sich über eine längere Anzuchtzeit nicht zurückbildet und einer initialen Differenzierung entspricht. Es ist anzunehmen, dass eine weiterführende Differenzierung mit Veränderung der intrazellulären Zytokeratinexpression zusätzlicher Reize bedarf, wie die Anhebung der Zellen an die Luft-Flüssigkeitsgrenze.

## 9 Zusammenfassung

Ziel dieser *in vitro* Studie war, das Differenzierungsverhalten immortalisierter und primärer gingivaler Keratinozyten in Bezug auf die Expression intrazellulärer Marker zu untersuchen. Die immortalisierten Zellen entstammten einer klonalen Zelllinie gingivaler Keratinozyten, die mit einem viralen Plasmid transfiziert wurden. Die primären Zellen wurden aus Biopsaten isoliert, in Zellkulturfラスchen inkubiert und vermehrt. Die Differenzierung wurde durch  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und FCS-haltiges Nährmedium eingeleitet. Über ein Zeitraum von zwölf Tagen wurden die Zellen inkubiert und im undifferenzierten Zustand und nach 1, 3, 6, 9 und 12 Tagen Proben fixiert und eingefroren. Im Durchflusszytometer wurden die Zellen auf die Expression von Zytokeratinen und apoptotischen Markern untersucht. Darüber hinaus wurden immortalisierte humane gingivale Keratinozyten auf Zellkultureinsätzen ausgesät und die Ausbildung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) bestimmt.

Die Expression der untersuchten Proteine ließ den Schluss zu, dass es sich bei den untersuchten Zellen um gering differenzierte Keratinozyten handelt. Eine deutliche Veränderung der Expressionsstärke mit Zunahme der Differenzierungsdauer war nicht zu beobachten. Es wurden keine grundlegenden Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen immortalisierten und primären, gingivalen Keratinozyten festgestellt. Die auf Zellkultureinsätzen untersuchten Zellen zeigten eine deutliche Zunahme des TER und damit das Bild einer beginnenden Differenzierung.

## 10 Summary

The aim of the current *in vitro* study was to investigate the differentiation of immortalized and primary gingival keratinocytes by analysis of the expression of intracellular markers. Human gingival keratinocytes obtained by oral surgery procedures and immortalised human gingival keratinocytes, were used. The cells were cultured in cellculture flasks and differentiated over 12 days using a culture medium containing  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and fetal calf serum. At different stages the cells were collected and frozen: undifferentiated and after 1, 3, 6, 9 and 12 days of differentiation. The pattern of cytokeratines and apoptotic markers was investigated using flow cytometry. Moreover, immortalised human gingival keratinocytes were seeded on cell inserts and the establishment of transepithelial electrical resistance (TER) was observed.

In conclusion, the expression of proteins suggests a marginal differentiation of the analysed keratinocytes. There were no essential differences between immortalised and primary human gingival keratinocytes. The cells grown on cell inserts showed a clear increase of TER, correlating with the initiation of differentiation.



## 11 Abkürzungsverzeichnis

Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FS	<i>forward scatter</i> , Vorwärtslichtstreuung abhängig von der Zellgröße
HaCaT	<i>Human adult low Calcium high Temperature</i> Keratinocyten
IF	Intermediärfilament
IHGK	Immortalisierte humane gingivale Keratinozyten
K	Keratin, Zytokeratin
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PHGK	Primäre humane gingivale Keratinozyten
SS	<i>sidescatter</i> , Seitwärtslichtstreuung abhängig von der Zellgranularität
T	Tage in Differenzierungsmedium
TER	<i>transepithelial electrical Resistance</i> ; transepithelialer elektrischer Widerstand
U/min	Umdrehungen pro Minute
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

**12 Tabellenverzeichnis**

**P-Werte zu den Abbildungen 26-34**

Tabelle 33: Die anhand des t-Testes ermittelten p-Werte, zum Vergleich der beiden Zelltypen in Bezug zu einem ausgewählten Antikörper.

	T0	T1	T3	T6	T9	T12
Zytokeratin 2	0,763	0,923	0,428	0,207	0,210	0,230
Zytokeratin 10	0,161	0,447	0,055	0,784	0,024	0,237
Zytokeratin 14	0,082	0,172	0,138	0,034	0,001	0,015
Zytokeratin 17	0,254	0,626	0,613	0,738	0,414	0,795
Zytokeratin 18	0,398	0,068	0,385	0,598	0,057	0,938
Zytokeratin 19	0,265	0,330	0,419	0,189	0,162	0,093
Bax	0,523	0,750	0,398	0,521	0,587	0,839
Bcl-x	0,085	0,111	0,154	0,514	0,237	0,518
Caspase 14	0,011	0,653	0,775	0,377	0,150	0,552

## Ergebnisse der TER-Berechnung

Tabelle 34: TER-Werte ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) der IHGK von Passage P23, P26 und P29 zu den Zeitpunkten T0 bis T12. Die Widerstandsfläche ( $0,66\text{cm}^2$ ) und der Leerwert der Zellkultureinsätze ist bei den Werten mit eingerechnet.

Zellkultureinsatz	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
IHGK.P23 11	14,30	54,56	67,98	65,78	29,04	24,64	29,26	36,96	43,56	49,06	43,56	32,56	27,06
IHGK.P23 12	5,94	52,36	66,44	57,42	54,78	40,04	44,22	40,48	41,36	47,08	58,08	35,42	30,80
IHGK.P23 13	8,14	49,72	59,18	55,44	44,66	41,36	39,82	43,34	44,00	48,18	30,80	40,48	29,70
IHGK.P23 14	7,92	56,10	64,90	65,78	44,22	45,76	43,12	46,86	45,54	53,90	42,46	44,22	30,36
IHGK.P23 15	12,32	66,22	73,70	78,10	29,04	73,70	65,34	67,10	66,22	63,58	53,46	53,24	47,08
IHGK.P26 11	8,58	44,66	55,22	69,96	46,42	40,92	45,76	30,36	27,50	27,50	37,62	39,16	44,22
IHGK.P26 12	4,62	48,18	55,44	64,02	47,96	42,24	47,52	43,12	36,74	45,54	49,94	55,44	68,86
IHGK.P26 13	6,16	52,80	56,32	73,04	58,52	41,58	37,18	46,20	39,38	44,22	48,62	58,30	59,84
IHGK.P26 14	5,94	35,42	46,20	57,86	47,52	44,22	42,02	53,02	36,74	47,30	51,04	55,88	62,70
IHGK.P26 15	5,28	52,58	59,62	69,96	68,20	62,04	50,82	53,02	58,52	66,44	64,02	63,80	66,88
IHGK.P29 11	8,58	36,30	41,36	46,86	49,06	48,18	48,40	41,80	47,30	41,14	32,34	35,64	40,26
IHGK.P29 12	11,44	58,74	62,04	62,26	55,88	53,68	45,10	43,12	48,62	45,76	35,64	37,62	39,38
IHGK.P29 13	6,60	51,70	50,16	55,22	47,08	43,78	26,62	38,28	49,50	43,34	22,00	39,60	32,34
IHGK.P29 14	9,24	33,88	39,38	44,22	43,56	54,78	47,74	44,00	62,26	53,90	38,72	37,84	40,04
IHGK.P29 15	8,80	36,30	49,94	60,94	68,20	65,12	70,40	61,60	80,52	62,92	53,46	60,50	52,80
Mittelwert	7,83	48,21	55,71	61,51	50,36	49,81	46,72	46,59	48,87	49,34	44,16	46,94	46,09
Standardabweichung	2,25	9,75	9,68	9,59	10,25	10,57	10,80	9,46	13,90	10,25	11,83	10,31	13,92

### 13 Literaturverzeichnis

- [Alberts et al. 2002] ALBERTS, Bruce ; JOHNSON, Alexander ; LEWIS, Julian ; RAFF, Martin ; ROBERTS, Keith ; WALTER, Peter: *Molecular Biology of the Cell*. 4. Garland Science, 2002
- [Alibardi et al. 2004] ALIBARDI, LORENZO ; DOCKAL, Michael ; REINISCH, Christina ; TSCHACHLER, Erwin ; ECKHART, Leopold: Ultrastructural Localization of Caspase-14 in Human Epidermis. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52 (2004), Nr. 12, S. 1561–1574
- [Altucci und Gronemeyer 2001] ALTUCCI, Lucia ; GRONEMEYER, Hinrich: The promise of retinoids to fight against cancer. In: *Nature Reviews. Cancer* 1 (2001), S. 181–193
- [Ballaun et al. 2008] BALLAUN, Claudia ; KARNER, Susanne ; MRASS, Paul ; MILDNER, Michael ; BUCHBERGER, Maria ; BACH, Jürgen ; BAN, Jozef ; HARANT, Hanna ; TSCHACHLER, Erwin ; ECKHART, Leopold: Transcription of the caspase-14 gene in human epidermal keratinocytes requires AP-1 and NF-kappaB. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (2008), S. 261–266
- [Barrett et al. 1998] BARRETT, A.W. ; SELVARAJAH, S. ; FRANNEY, S. ; WILLS, K.-A. ; BERKOVITZ, B. K. B.: Interspecies variations in oral epithelial cytokeratin expression. In: *Journal of Anatomy* 193 (1998), S. 185–193
- [Beil et al. 2003] BEIL, Michael ; MICOULET, Alexandre ; WICHERT, Götz von ; PASCHKE, Stephan ; WALTHER, Paul ; OMARY, M. B. ; VELDHOVEN, Paul P. V. ; GERN, Ulrike ; WOLFF-HIEBER, Elke ; EGGERMANN, Juliane ; WALTENBERGER, Johannes ; ADLER, Guido ; SPATZ, Joachim ; SEUFFERLEIN, Thomas: Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. In: *Nature Cell Biology* 5 (2003), Nr. 9, S. 803–811
- [de Berker et al. 2000] BERKER, D. de ; WOJNAROWSKA, F. ; SVILAND, L. ; WESTGATE, G. E. ; DAWBER, R. P. R. ; LEIGH, I. M.: Keratin expression in the normal nail unit: markers of regional differentiation. In: *British Journal of Dermatology* 142 (2000), S. 89–96
- [Bernerd und Asselineau 1997] BERNERD, Françoise ; ASSELINEAU, Daniel: Successive alteration

and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. In: *Developmental Biology* 183 (1997), Nr. 2, S. 123–138

[Bhardwaj und Aggarwal 2003] BHARDWAJ, Anjana ; AGGARWAL, Bharat B.: Receptor-Mediated Choreography of Life and Death. In: *Journal of Clinical Immunology* 23 (2003), Nr. 5, S. 317–332

[Blank und Shiloh 2007] BLANK, Michael ; SHILOH, Yosef: Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. In: *Cell Cycle* 6 (2007), Nr. 6, S. 686–695

[Bloor et al. 2003] BLOOR, Balvinder K. ; TIDMAN, Nicholas ; LEIGH, Irene M. ; ODELL, Edward ; DOGAN, Bilal ; WOLLIN, Uwe ; GHALI, Lucy ; WASEEM, Ahmad: Expression of Keratin K2e in Cutaneous and Oral Lesions. In: *American Journal of Pathology* 162 (2003), Nr. 3, S. 963–975

[Bragulla und Homberger 2009] BRAGULLA, Hermann H. ; HOMBERGER, Dominique G.: Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. In: *Journal of Anatomy* 214 (2009), Nr. 4, S. 516–59

[Byrne et al. 1994] BYRNE, Carolyn ; TAINSKY, Michael ; FUCHS, Elaine: Programming gene expression in developing epidermis. In: *Development* 120 (1994), S. 2369–2383

[Candi et al. 2008] CANDI, E. ; CIPOLLONE, R. ; VAL CERVO, P. R. di ; GONFLONI, S. ; MELINO, G. ; KNIGHT, R.: p63 in epithelial development. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (2008), Nr. 20, S. 3126–3133

[Candi et al. 2006] CANDI, E. ; RUFINI, A. ; TERRINONI, A. ; DINSDALE, D. ; RANALLI, M. ; PARADISI, A. ; DE LAURENZI, V. ; SPAGNOLI, L. G. ; CATANI, M. V. ; RAMADAN, S. ; KNIGHT, R. A. ; MELINO, G.: Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. In: *Cell Death and Differentiation* 13 (2006), Nr. 6, S. 1037–1047

[Chan und Yu 2004] CHAN, Shing-Leng ; YU, Victor C.: Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31 (2004), S. 119–128

- [Chou et al. 1993] CHOU, Chih-Fong ; RIOPEL, Carrie L. ; ROTT, Lusijah S. ; OMARY, M. B.: A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. In: *Journal of Cell Science* 105 (1993), S. 433–444
- [Cohen und Parry 1990] COHEN, Carolyn ; PARRY, David A. D.: Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. In: *Proteins* 7 (1990), Nr. 1, S. 1–15
- [Collin et al. 1992] COLLIN, Christine ; MOLL, Roland ; KUBICKA, Stefan ; OUHAYOUN, Jean-Pierre ; FRANKE, Werner W.: Characterization of Human Cytokeratin 2, an Epidermal Cytoskeletal Protein Synthesized Late during Differentiation. In: *Experimental Cell Research* 202 (1992), S. 132–141
- [Coulombe et al. 1989] COULOMBE, Pierre A. ; KOPAN, Raphael ; FUCHS, Elaine: Expression of Keratin K14 in the Epidermis and Hair Follicle: Insights into Complex Programs of Differentiation. In: *The Journal of Cell Biology* 109 (1989), S. 2295–2312
- [Coulombe und Omary 2002] COULOMBE, Pierre A. ; OMARY, M. B.: 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. In: *Current Opinion in Cell Biology* 14 (2002), S. 110–122
- [Coulombe und Wong 2004] COULOMBE, Pierre A. ; WONG, Pauline: Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. In: *Nature Cell Biology* 6 (2004), Nr. 8, S. 699–706
- [Delcourt-Huard et al. 1997] DELCOURT-HUARD, Agnes ; CORLU, Anne ; JOFFRE, Annick ; MAGLOIRE, Henry ; BONNAURE-MALLET, Martine: Reconstituted human gingival epithelium: submerged in vitro model. In: *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal* 33 (1997), Nr. 1, S. 30–36
- [Denecker et al. 2008] DENECKER, Geertrui ; OVAERE, Petra ; VANDENABEELE, Peter ; DECLERCQ, Wim: Caspase-14 reveals its secrets. In: *The Journal of Cell Biology* 180 (2008), Nr. 3, S. 451–458
- [Descargues et al. 2008] DESCARGUES, Pascal ; SIL, Alok K. ; KARIN, Michael: IKKalpha, a critical regulator of epidermal differentiation and a suppressor of skin cancer. In: *The EMBO Journal* 27 (2008), Nr. 20, S. 2639–2647

- [Eichner 1986] EICHNER, Riva: Epidermal effects of retinoids: In vitro studies. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 15 (1986), Nr. 2, S. 789–797
- [van Engeland et al. 1997] ENGELAND, Manon van ; KUIJPERS, Helma J. H. ; RAMAEKERS, Frans C. S. ; REUTELINGSPERGER, Chris P. M. ; SCHUTTE, Bert: Plasma Membrane Alterations and Cytoskeletal Changes in Apoptosis. In: *Experimental Cell Research* 235 (1997), S. 421–430
- [Fickert et al. 2002] FICKERT, Peter ; TRAUNER, Michael ; FUCHSBICHLER, Andrea ; STUMPTNER, Conny ; ZATLOUKAL, Kurt ; DENK, Helmut: Cytokeratins as Targets for Bile Acid-Induced Toxicity. In: *American Journal of Pathology* 160 (2002), Nr. 2, S. 491–499
- [Foisner und Wiche 1991] FOISNER, Roland ; WICHE, Gerhard: Intermediate filament-associated proteins. In: *Current Opinion in Cell Biology* 3 (1991), S. 75–81
- [Fuchs 1995] FUCHS, Elaine: Keratins and the skin. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11 (1995), S. 123–53
- [Fuchs 2008] FUCHS, Elaine: Skin stem cells: rising to the surface. In: *The Journal of Cell Biology* 180 (2008), Nr. 2, S. 273–284
- [Fuchs und Raghavan 2002] FUCHS, Elaine ; RAGHAVAN, Srikala: Getting under the skin of epidermal morphogenesis. In: *Nature Reviews Genetics* 3 (2002), Nr. 3, S. 199–209
- [Gandarillas 2000] GANDARILLAS, Alberto: Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? In: *Experimental Gerontology* 35 (2000), Nr. 1, S. 53–62
- [Gangatirkar et al. 2007] GANGATIRKAR, Pradnya ; PAQUET-FIFIELD, Sophie ; LI, Amy ; ROSSI, Ralph ; KAUR, Pritinder: Establishment of 3D organotypic cultures using human neonatal epidermal cells. In: *Nature Protocols* 2 (2007), Nr. 1, S. 178–186
- [Garant 2003] GARANT, Philius R.: *Oral Cells and Tissues*. Quintessence Books, 2003
- [Garzón et al. 2009] GARZÓN, I ; SÁNCHEZ-QUEVEDO, M. C. ; MOREU, G. ; GONZÁLEZ-JARANAY, M. ; GONZÁLEZ-ANDRADES, M. ; MONTALVO, A. ; CAMPOS, A. ; ALAMINOS, M.: In vitro and in vivo cytokeratin

- patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. In: *Journal of Periodontal Research* 44 (2009), Nr. 5, S. 588–597
- [Georgatos et al. 1997] GEORGATOS, Spyros D. ; GOUNARI, Fotini ; GOULIELMOS, George ; AEBI, Ueli: To bead or not to bead? Lens-specific intermediate filaments revisited. In: *Journal of Cell Science* 110 (1997), S. 2629–2634
- [Gröger et al. 2010] GRÖGER, S ; DOMAN, E ; CHAKRABORTY, T ; MEYLE, J: Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection on human gingival epithelial barrier function in vitro. In: *European Journal of Oral Science* 118 (2010), Nr. 6, S. 582–589
- [Gröger et al. 2008] GRÖGER, S. ; MICHEL, J. ; MEYLE, J.: Establishment and characterization of immortalized human gingival keratinocyte cell lines. In: *Journal of Periodontal Research* 43 (2008), S. 604–614
- [Gu und Coulombe 2007] GU, Li-Hong ; COULOMBE, Pierre A.: Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. In: *Current Opinion in Cell Biology* 19 (2007), S. 13–23
- [Hansson et al. 2003] HANSSON, Annette ; BLOOR, Balvinder K. ; SARANG, Zsolt ; HAIG, Ylva ; MORGAN, Peter R. ; STARK, Hans-Jürgen ; FUSENIG, Norbert E. ; EKSTRAND, Jan ; GRAFSTRÖM, Roland C.: Analysis of proliferation, apoptosis and keratin expression in cultured normal and immortalized human buccal keratinocytes. In: *European Journal of Oral Science* 111 (2003), S. 34–41
- [Hawley-Nelson et al. 1980] HAWLEY-NELSON, Pamela ; SULLIVAN, James E. ; KUNG, Margaret ; HENNINGS, Henry ; YUSPA, Stuart H.: Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. In: *The Journal of Investigative Dermatology* 75 (1980), Nr. 176-182
- [Hayflick und Moorhead 1961] HAYFLICK, L. ; MOORHEAD, P. S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. In: *Experimental Cell Research* 25 (1961), S. 585–621
- [Helfand et al. 2004] HELFAND, Brian T. ; CHANG, Lynne ; GOLDMAN, Robert D.: Intermediate filaments



- are dynamic and motile elements of cellular architecture. In: *Journal of Cell Science* 117 (2004), S. 133–141
- [Herrmann und Aebi 2004] HERRMANN, Harald ; AEBI, Ueli: Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds. In: *Annual Review of Biochemistry* 73 (2004), S. 749–489
- [Hitomi 2005] HITOMI, Kiyotaka: Transglutaminases in skin epidermis. In: *European Journal of Dermatology* 15 (2005), Nr. 5, S. 313–319
- [Ho und Hawkins 2005] HO, Poki ; HAWKINS, Christine J.: Mammalian initiator apoptotic caspases. In: *FEBS Journal* 272 (2005), S. 5436–5453
- [Irvine und McLean 1999] IRVINE, A. D. ; McLEAN, W. H. I.: Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. In: *British Journal of Dermatology* 140 (1999), S. 815–828
- [Jang et al. 2005] JANG, Shyh-Ing ; KALININ, Alexandr ; TAKAHASHI, Kaoruko ; MAREKOV, Lyuben N. ; STEINERT, Peter M.: Characterization of human epiplakin: RNAi-mediated epiplakin depletion leads to the disruption of keratin and vimentin IF networks. In: *Journal of Cell Science* 118 (2005), Nr. 4, S. 781–793
- [Kaufmann und Hengartner 2001] KAUFMANN, Scott H. ; HENGARTNER, Michael O.: Programmed cell death: alive and well in the new millennium. In: *Trends in Cell Biology* 11 (2001), Nr. 12, S. 526–534
- [Koçak et al. 2003] KOÇAK, Mukadder ; BOZDOĞAN, Önder ; ERKEK, Emel ; ATASOY, Pınar ; BİROL, Ahu: Examination of Bcl-2, Bcl-X and bax protein expression in psoriasis. In: *International Journal of Dermatology* 42 (2003), S. 789–793
- [Kolly et al. 2005] KOLLY, Carine ; SUTER, Maja M. ; MÜLLER, Eliane J.: Proliferation, Cell Cycle Exit, and Onset of Terminal Differentiation in Cultured Keratinocytes: Pre-Programmed Pathways in

- Control of C-Myc and Notch1 Preval Over Extracellular Calcium Signals. In: *Journal of Investigative Dermatology* 124 (2005), S. 1014–1025
- [Korge et al. 1992] KORGE, Bernhard P. ; GAN, Song-Qing ; McBRIDE, Wesley ; MISCHKE, Dietmar ; STEINERT, Peter M.: Extensive size polymorphism of the human keratin 10 chain resides in the C-terminal V2 subdomain due to variable numbers and sizes of glycine loops. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992), S. 910–914
- [Krajewski et al. 1994a] KRAJEWSKI, Stanislaw ; KRAJEWSKA, Maryla ; SHABAIK, Ahmed ; MIYASHITA, Toshiyuki ; WANG, Hong G. ; REED, John C.: Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. In: *American Journal of Pathology* 145 (1994), Nr. 6, S. 1323–1336
- [Krajewski et al. 1994b] KRAJEWSKI, Stanislaw ; KRAJEWSKA, Maryla ; SHABAIK, Ahmed ; WANG, Hong G. ; IRIE, Shinji ; FONG, Linda ; REED, John C.: Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. In: *Cancer Research* 54 (1994), Nr. 21, S. 5501–5507
- [Lalli et al. 2008] LALLI, Anand ; TILAKARATNE, Wanninayake M. ; ARIYAWARDANA, Anura ; FITCHETT, Caroline ; LEIGH, Irene M. ; HAGI-PAVLI, Eleni ; CRUCHLEY, Alan T. ; PARKINSON, E K. ; TEH, Muy-Teck ; FORTUNE, Farida ; WASEEM, Ahmad: An altered keratinocyte phenotype in oral submucous fibrosis: correlation of keratin K17 expression with disease severity. In: *Journal of Oral Pathology and Medicine* 37 (2008), Nr. 4, S. 211–220
- [Lauer 1994] LAUER, G: Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. Method and clinical application. In: *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 22 (1994), Feb, Nr. 1, S. 18–22. – ISSN 1010-5182 (Print); 1010-5182 (Linking)
- [Lawen 2003] LAWEN, Alfons: Apoptosis - an introduction. In: *BioEssays* 25 (2003), S. 888–896
- [Lee et al. 2009] LEE, Ding-Dar ; STOJADINOVIC, Olivera ; KRZYZANOWSKA, Agata ; VOUTHOUNIS, Constantinos ; BLUMENBERG, Miroslav ; TOMIC-CANIC, Marjana: Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes. In: *Journal of Cellular Physiology* 220 (2009), Nr. 2, S. 427–439

- [Lefort und Dotto 2004] LEFORT, Karine ; DOTTO, G. P.: Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. In: *Seminars in Cancer Biology* 14 (2004), S. 374–386
- [Leigh et al. 1995] LEIGH, I. M. ; NAVSARIA, H. ; PURKIS, P. E. ; MCKAY, I. A. ; BOWDEN, P. E. ; RIDDLE, P. N.: Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. In: *British Journal of Dermatology* 133 (1995), S. 501–511
- [Leung et al. 2002] LEUNG, Conrad L. ; GREEN, Kathleen J. ; LIEM, Ronald K. H.: Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. In: *Trends in Cell Biology* 12 (2002), Nr. 1, S. 37–45
- [Lippens et al. 2005] LIPPENS, S. ; DENECKER, G. ; OVAERE, P. ; VANDENABEELE, P. ; DECLERCQ, W.: Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. In: *Cell Death and Differentiation* 12 (2005), S. 1497–1508
- [Lippens et al. 2000] LIPPENS, S. ; KOCKX, M. ; KNAAPEN, M. ; MORTIER, L. ; POLAKOWSKA, R. ; VERHEYEN, A. ; GARMYN, M. ; ZWIJSEN, A. ; FORMSTECHEER, P. ; HUYLEBROECK, D. ; VANDENABEELE, P. ; DECLERCQ, W.: Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. In: *Cell Death and Differentiation* 7 (2000), S. 1218–1224
- [Little und Jochemsen 2002] LITTLE, Natalie A. ; JOCHEMSEN, Aart G.: p63. In: *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34 (2002), S. 6–9
- [Löe et al. 1965] LÖE, Harald ; THEILANDE, Else ; JENSEN, S. B.: Experimental Gingivitis in Man. In: *Journal of Periodontology* 36 (1965), Nr. 3, S. 177–187
- [Loranger et al. 2006] LORANGER, Anne ; GILBERT, Stéphane ; BROUARDA, Jean-Simon ; MAGINC, Thomas M. ; MARCEAU, Normand: Keratin 8 modulation of desmoplakin deposition at desmosomes in hepatocytes. In: *Experimental Cell Research* 312 (2006), S. 4108–4119
- [Lüllmann-Rauch 2003] LÜLLMANN-RAUCH, Renate: *Histologie*. Thieme, 2003

- [Lynch et al. 1986] LYNCH, Marion H. ; O'GUIN, W. M. ; HARDY, Carolyn ; MAK, Linda ; SUN, Tung-Tien: Acidic and Basic Hair/Nail ('Hard') Keratins: Their Colocalization in Upper Cortical and Cuticle Cells of the Human Hair Follicle and Their Relationship to 'Soft' Keratins. In: *The Journal of Cell Biology* 103 (1986), Nr. 6, S. 2593–2606
- [Marinari et al. 2009] MARINARI, Barbara ; BALLARO, Costanza ; KOSTER, Maranke I. ; GIUSTIZIERI, Maria L. ; MORETTI, Francesca ; CROSTI, Francesca ; PAPOUTSAKI, Marina ; KARIN, Michael ; ALEMA, Stefano ; CHIMENTI, Sergio ; ROOP, Dennis R. ; COSTANZO, Antonio: IKKalpha is a p63 transcriptional target involved in the pathogenesis of ectodermal dysplasias. In: *Journal of Investigative Dermatology* 129 (2009), Nr. 1, S. 60–69
- [Martelli et al. 2001] MARTELLI, Alberto M. ; ZWEYER, Marina ; OCHS, Robert L. ; TAZZARI, Pier L. ; TABELLINI, Giovanna ; NARDUCCI, Paola ; BORTUL, Roberta: Nuclear apoptotic changes: An overview. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 82 (2001), Nr. 4, S. 634–646
- [Maruoka et al. 1997] MARUOKA, Yuka ; HARADA, Hidemitsu ; MITSUYASU, Takeshi ; SETA, Yuji ; KUROKAWA, Hideo ; KAJIYAMA, Minoru ; TOYOSHIMA, Kuniaki: Keratinocytes Become Terminally Differentiated in a Process Involving Programmed Cell Death. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238 (1997), S. 886–890
- [Matter et al. 2005] MATTER, Karl ; AJAZ, Saima ; TSAPARA, Anna ; BALDA, Maria S.: Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. In: *Current Opinion in Cell Biology* 17 (2005), Nr. 5, S. 453–458
- [Meredith et al. 1993] MEREDITH, Jere E. ; FAZELI, Babak ; SCHWARTZ, Martin A.: The extracellular matrix as a cell survival factor. In: *Molecular Biology of the Cell* 4 (1993), Nr. 9, S. 953–961
- [Metcalf und Streuli 1997] METCALFE, Anthony ; STREULI, Charles: Epithelial apoptosis. In: *BioEssays* 19 (1997), Nr. 8, S. 711–720
- [Meyle et al. 1999] MEYLE, J ; GÜLTIG, K ; RASCHER, G ; WOLBURG, H: Transepithelial electrical resi-

- stance and tight junctions of human gingival keratinocytes. In: *Journal of Periodontal Research* 34 (1999), Nr. 4, S. 214–222
- [Micheelis und Schiffner 2006] MICHEELIS, Wolfgang ; SCHIFFNER, Ulrich: *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV)*. Deutscher Zahnärzte Verlag, 2006
- [Michel et al. 1996] MICHEL, Martine ; TÖRÖK, Natalie ; GODBOUT, Marie-Josée ; LUSSIER, Marc ; GAUDREAU, Pierrette ; ROYAL, André ; GERMAIN, Lucie: Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: Keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. In: *Journal of Cell Science* 109 (1996), S. 1017–1028
- [Miller et al. 1993] MILLER, Rita K. ; KHUON, Satya ; GOLDMAN, Robert D.: Dynamics of Keratin Assembly: Exogenous Type I Keratin Rapidly Associates with Type II Keratin in vivo. In: *The Journal of Cell Biology* 22 (1993), Nr. 1, S. 123–135
- [Miller et al. 1991] MILLER, Rita K. ; VIKSTROM, Karen ; GOLDMAN, Robert D.: Keratin Incorporation into Intermediate Filament Networks Is a Rapid Process. In: *The Journal of Cell Biology* 113 (1991), Nr. 4, S. 843–855
- [Mills et al. 1999] MILLS, Alea A. ; ZHENG, Binhai ; WANG, Xiao-Jing ; VOGELK, Hannes ; ROOP, Dennis R. ; BRADLEY, Allan: p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. In: *Nature* 398 (1999), S. 708–713
- [Mischke 1998] MISCHKE, Dietmar: The complexity of gene families involved in epithelial differentiation. Keratin genes and the epidermal differentiation complex. In: *Subcellular Biochemistry* 31 (1998), S. 71–104
- [Moll et al. 1982] MOLL, Ôð°Roland ; FRANKE, Werner W. ; SCHILLER, Dorothea L. ; GEIGER, Benjamin ; KREPLER, Reinhard: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. In: *Cell* 31 (1982), Nr. 1, S. 11–24

- [Nguyen und Hussain 2007] NGUYEN, Dao M. ; HUSSAIN, Mustafa: The role of the mitochondria in mediating cytotoxicity of anti-cancer therapies. In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39 (2007), Nr. 1, S. 13–21
- [Nicotera und Melino 2007] NICOTERA, Pierluigi ; MELINO, Gerry: Caspase-14 and epidermis maturation. In: *Nature Cell Biology* 9 (2007), Nr. 6, S. 621–622
- [Norsgaard et al. 1996] NORSGAARD, Hanne ; CLARK, Brian F. C. ; RATTAN, Suresh I. S.: Distinction between Differentiation and Senescence and the Absence of increased Apoptosis in Human Keratinocytes undergoing cellular aging in vitro. In: *Experimental Gerontology* 31 (1996), Nr. 5, S. 563–570
- [Oltvai et al. 1993] OLTVAI, Zoltan N. ; MILKMAN, Curt L. ; KORSMEYER, Stanley J.: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. In: *Cell* 74 (1993), Nr. 4, S. 609–619
- [Ortiz et al. 2000] ORTIZ, Alberto ; LORZ, Corina ; CATALÁN, Marina P. ; DANOFF, Theodore M. ; YAMASAKI, Yasushi ; EGIDO, Jesús ; NEILSON, Eric G.: Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. In: *Kidney International* 57 (2000), S. 969–981
- [Page 1986] PAGE, Roy C.: Gingivitis. In: *Journal of Clinical Periodontology* 13 (1986), S. 345–355
- [Page und Kornman 1997] PAGE, Roy C. ; KORNMANN, Kenneth S.: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. In: *Periodontology 2000* 14 (1997), S. 9–11
- [Papaioannou et al. 1999] PAPAIOANNOU, William ; CASSIMAN, Jean-Jacques ; OORD, Joost van den ; Vos, Rita D. ; STEENBERGHE, Daniel van ; QUIRYNEN, Marc: Multi-Layered Periodontal Pocket Epithelium Reconstituted In Vitro: Histology and Cytokeratin Profiles. In: *Journal of Periodontology* 70 (1999), Nr. 6, S. 668–678

- [Parry und North 1998] PARRY, David A. D. ; NORTH, A. C. T.: Hard alpha-Keratin Intermediate Filament Chains: Substructure of the N- and C-Terminal Domains and the Predicted Structure and Function of the C-Terminal Domains of Type I and Type II Chains. In: *Journal of Structural Biology* 122 (1998), S. 67–75
- [Parry und Steinert 1992] PARRY, David A. D. ; STEINERT, Peter M.: Intermediate Filament Structure. In: *Current Opinion in Cell Biology* 4 (1992), Nr. 1, S. 94–98
- [Parsa et al. 1999] PARSA, Ramine ; YANG, Annie ; McKEON, Frank ; GREEN, Howard: Association of p63 with Proliferative Potential in Normal and Neoplastic Human Keratinocytes. In: *Journal of Investigative Dermatology* 113 (1999), S. 1099–1105
- [Pena et al. 1997] PENA, John C. ; FUCHS, Elaine ; THOMPSON, Craig B.: Bcl-x Expression Influences Keratinocyte Cell Survival but not Terminal Differentiation. In: *Cell Growth & Differentiation* 8 (1997), S. 619–629
- [Pillai et al. 1990] PILLAI, Sreekumar ; BIKLE, Daniel D. ; MANCIANTI, Maria-Laura ; CLINE, Polly ; HINCENBERGS, Mara: Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Normal Human Keratinocytes: Modulation of Differentiation Competence by Stages of Growth and Extracellular Calcium. In: *Journal of Cellular Physiology* 143 (1990), S. 294–302
- [Pontiggia et al. 2009] PONTIGGIA, Luca ; BIEDERMANN, Thomas ; MEULI, Martin ; WIDMER, Daniel ; BÖTTCHER-HABERZETH, Sophie ; SCHIESTL, Clemens ; SCHNEIDER, Jörg ; BRAZIULIS, Erik ; MONTAÑO, Irene ; MEULI-SIMMEN, Claudia ; REICHMANN, Ernst: Markers to evaluate the quality and self-renewing potential of engineered human skin substitutes in vitro and after transplantation. In: *Journal of Investigative Dermatology* 129 (2009), Nr. 2, S. 480–490
- [Presland und Jurevic 2002] PRESLAND, Richard B. ; JUREVIC, Richard J.: Making Sense of the Epithelial Barrier: What Molecular Biology and Genetics Tell Us About the Functions of Oral Mucosal and Epidermal Tissues. In: *Journal of Dental Education* 66 (2002), Nr. 4, S. 564–574
- [Raff 1998] RAFF, Martin: Cell suicides for beginners. In: *Nature* 396 (1998), S. 119–122

- [Rangarajan et al. 2001] RANGARAJAN, Annapoorni ; TALORA, Claudio ; OKUYAMA, Ryuhei ; NICOLAS, Michael ; MAMMUCARI, Cristina ; OH, Heysun ; ASTER, Jon C. ; KRISHNA, Sudhir ; METZGER, Daniel ; CHAMBON, Pierre ; MIELE, Lucio ; AGUET, Michel ; RADTKE, Freddy ; DOTTO, G. P.: Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. In: *The EMBO Journal* 20 (2001), Nr. 13, S. 3427–3436
- [Rendl et al. 2002] RENDL, Michael ; BAN, Jozef ; MRASS, Paul ; MAYER, Christoph ; LENGAUER, Barbara ; ECKHART, Leopold ; DECLERQ, Wim ; TSCHACHLERN, Erwin: Caspase-14 Expression by Epidermal Keratinocytes is Regulated by Retinoids in a Differentiation-associated Manner. In: *Journal of Investigative Dermatology* 119 (2002), S. 1150–1155
- [Rogers et al. 2005] ROGERS, Michael A. ; EDLER, Lutz ; WINTER, Hermelita ; LANGBEIN, Lutz ; BECKMANN, Iris ; SCHWEIZER, Jürgen: Characterization of New Members of the Human Type II Keratin Gene Family and a General Evaluation of the Keratin Gene Domain on Chromosome 12q13.13. In: *Journal of Investigative Dermatology* 124 (2005), S. 536–544
- [Rogers et al. 2004] ROGERS, Michael A. ; WINTER, Hermelita ; LANGBEIN, Lutz ; BLEILER, Raphael ; SCHWEIZER, Jürgen: The human type I keratin gene family: Characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain. In: *Differentiation* 72 (2004), S. 527
- [Romano et al. 2009] ROMANO, Rose-Anne ; ORTT, Kori ; BIRKAYA, Barbara ; SMALLEY, Kirsten ; SINHA, Satrajit: An Active Role of the DealtN Isoform of p63 in Regulating Basal Keratin Genes K5 and K14 and Directing Epidermal Cell Fate. In: *PLoS ONE* 4 (2009), Nr. 5, S. e5623
- [Rugg und Leigh 2004] RUGG, Elizabeth L. ; LEIGH, Irene M.: The Keratins and Their Disorders. In: *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars on Medical Genetics)* 131C (2004), S. 4–11
- [Russell et al. 2004] RUSSELL, David ; ANDREWS, Paul D. ; JAMES, John ; LANE, E. B.: Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. In: *Journal of Cell Science* 17 (2004), S. 5233–5243



- [Sanvicens und Cotter 2006] SANVICENS, Nuria ; COTTER, Thomas G.: Ceramide is the key mediator of oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells. In: *Journal of Neurochemistry* 98 (2006), S. 1432–1444
- [Schröder 1981] SCHRÖDER, Hubert E.: *Differentiation of Human Oral Stratified Epithelia*. Bd. 1. Karger, 1981
- [Schröder 2000] SCHRÖDER, Hubert E.: *Orale Strukturbiologie*. 5. Thieme, 2000
- [Schug et al. 2007] SCHUG, Thaddeus T. ; BERRY, Daniel C. ; SHAW, Natacha S. ; TRAVIS, Skylar N. ; NOY, Noa: Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. In: *Cell* 129 (2007), Nr. 4, S. 723–733
- [Schweizer et al. 2006] SCHWEIZER, Jürgen ; BOWDEN, Paul E. ; COULOMBE, Pierre A. ; LANGBEIN, Lutz ; LANE, E. B. ; MAGIN, Thomas M. ; MALTAIS, Lois ; OMARY, M. B. ; PARRY, David A. ; ROGERS, Michael A. ; WRIGHT, Mathew W.: New consensus nomenclature for mammalian keratins. In: *The Journal of Cell Biology* 174 (2006), Nr. 2, S. 169–174
- [Scott und Untereiner 2004] SCOTT, J A. ; UNTEREINER, W A.: Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. In: *Medical Mycology* 42 (2004), Nr. 3, S. 239–246
- [Sil et al. 2004] SIL, A K. ; MAEDA, S ; SANO, Y ; ROOP, D R. ; KARIN, M: I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. In: *Nature* 428 (2004), Nr. 6983, S. 660–664
- [Six et al. 2003] SIX, Emmanuelle ; NDIAYE, Delphine ; LAËBI, Yacine ; BROU, Christel ; GUPTA-ROSSI, Neetu ; ISRAËL, Alain ; LOGEAT, Frédérique: The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and -secretase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), Nr. 13, S. 7638–7643
- [Spazierer et al. 2006] SPAZIERER, Daniel ; FUCHS, Peter ; REIPERT, Siegfried ; FISCHER, Irmgard ; SCHMUTH, Matthias ; LASSMANN, Hans ; WICHE, Gerhard: Epiplakin Is Dispensable for Skin Barrier

- Function and for Integrity of Keratin Network Cytoarchitecture in Simple and Stratified Epithelia. In: *Molecular and Cellular Biology* 26 (2006), Nr. 2, S. 559–568
- [Squier und Kremer 2001] SQUIER, Christopher A. ; KREMER, Mary J.: Biology of Oral Mucosa and Esophagus. In: *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 7 (2001), S. 7–15
- [Steinert 1990] STEINERT, Peter M.: The Two-chain Coiled-coil Molecule of Native Epidermal Keratin Intermediate Filaments Is a Type I-Type II Heterodimer. In: *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), Nr. 15, S. 8766–8774
- [Steinert und Marekov 1999] STEINERT, Peter M. ; MAREKOV, Lyuben N.: Initiation of Assembly of the Cell Envelope Barrier Structure of Stratified Squamous Epithelia. In: *Molecular Biology of the Cell* 10 (1999), S. 4247–4261
- [Steinert et al. 1993] STEINERT, Peter M. ; MAREKOV, Lyuben N. ; PARRY, David A. D.: Diversity of Intermediate Filament Structure. In: *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993), Nr. 33, S. 24916–24925
- [Strelkov et al. 2003] STRELKOV, Sergei V. ; HERRMANN, Harald ; AEBI, Ueli: Molecular architecture of intermediate filaments. In: *BioEssays* 25 (2003), Nr. 3, S. 243–251
- [Strelkov et al. 2002] STRELKOV, Sergei V. ; HERRMANN, Harald ; GEISLER, Norbert ; WEDIG, Tatjana ; ZIMBELMANN, Ralf ; AEBI, Ueli ; BURKHARD, Peter: Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. In: *The EMBO Journal* 21 (2002), Nr. 6, S. 1255–1266
- [Su et al. 1996] SU, Lan ; MORGAN, Peter R. ; LANE, E. B.: Keratin 14 and 19 expression in normal, dysplastic and malignant oral epithelia. A study using in situ hybridization and immunohistochemistry. In: *Journal of Oral Pathology and Medicine* 25 (1996), S. 293–301
- [Sun et al. 2001] SUN, Dongming ; LEUNG, Conrad L. ; LIEM, Ronald K. H.: Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a

- novel group of microtubule associated proteins. In: *Journal of Cell Science* 114 (2001), Nr. 1, S. 161–172
- [Svitkina et al. 1996] SVITKINA, Tatyana M. ; VERKHOVSKY, Alexander B. ; BORISY, Gary G.: Plectin Sidearms Mediate Interaction of Intermediate Filaments with Microtubules and Other Components of the Cytoskeleton. In: *Journal of Cell Biology* 135 (1996), Nr. 4, S. 991–1007
- [Szeverenyi et al. 2008] SZEVERENYI, Ildiko ; CASSIDY, Andrew J. ; CHUNG, Cheuk W. ; LEE, Bennett T. ; COMMON, John E. ; OGG, Stephen C. ; CHEN, Huijia ; SIM, Shu Y. ; GOH, Walter L. ; NG, Kee W. ; SIMPSON, John A. ; CHEE, Li L. ; ENG, Goi H. ; LI, Bin ; LUNNY, Declan P. ; CHUON, Danny ; VENKATESH, Aparna ; KHOO, Kian H. ; McLEAN, W.H. I. ; LIM, Yun P. ; LANE, E. B.: The Human Intermediate Filament Database: Comprehensive Information on a Gene Family Involved in Many Human Diseases. In: *Human Mutation* 29 (2008), Nr. 3, S. 351–360
- [Talora et al. 2008] TALORA, Claudio ; CAMPESE, Antonio F. ; BELLAVIA, Diana ; FELLI, Maria P. ; VACCA, Alessandra ; GULINO, Alberto ; SCREPANTI, Isabella: Notch signaling and diseases: An evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 (2008), S. 489–497
- [Tan und Lee 2009] TAN, Kong-Bing ; LEE, Yoke S.: Immunoexpression of Bcl-x in squamous cell carcinoma and keratoacanthoma: differences in pattern and correlation with pathobiology. In: *Histopathology* 55 (2009), Nr. 3, S. 338–45
- [Thamboo et al. 2006] THAMBOO, Thomas P. ; TAN, Leonard H.-C. ; TAN, Soo-Yong: Expression of Bcl-x in normal skin and benign cutaneous adnexal tumors. In: *Journal of Cutaneous Pathology* 33 (2006), Nr. 1, S. 27–32
- [Thomková et al. 1999] THOMKOVÁ, H. ; FUJIMOTO, W. ; ARATA, J.: Expression of the bcl-2 family of genes in the course of keratinocyte differentiation. In: *European Journal of Dermatology* 9 (1999), Nr. 3, S. 191–196

- [Villars et al. 1996] VILLARS, F. ; CONRAD, V. ; ROUAIS, F. ; LEFEBVRE, F. ; AMÉDÉE, J. ; BORDENAVE, L.: Ability of various inserts to promote endothelium cell culture for the establishment of coculture models. In: *Cell Biology and Toxicology* 12 (1996), S. 207–214
- [Waseem et al. 2004] WASEEM, Ahmad ; KARSTEN, Uwe ; LEIGH, Irene M. ; PURKIS, Patricia ; WASEEM, Naushin H. ; LANE, E. B.: Conformational Changes in the Rod Domain of Human Keratin 8 following Heterotypic Association with Keratin 18 and Its Implication for Filament Stability. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 5, S. 1283–1295
- [Wawersik et al. 1997] WAWERSIK, Matthew ; PALADINI, Rudolph D. ; NOENSIE, Erick ; COULOMBE, Pierre A.: A Proline Residue in the alpha-Helical Rod Domain of Type I Keratin 16 Destabilizes Keratin Heterotetramers. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 52, S. 32557–32565
- [Wei et al. 2009] WEI, K-J ; ZHANG, L ; YANG, X ; ZHONG, L-P ; ZHOU, X-J ; PAN, H-Y ; LI, J ; CHEN, W-T ; ZHANG, Z-Y: Overexpression of cytokeratin 17 protein in oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. In: *Oral Diseases* 15 (2009), Nr. 1, S. 111–117
- [Wetzels et al. 1991] WETZELS, Ria H. W. ; KUIJPERS, Helma J. H. ; LANE, E. B. ; LEIGH, Irene M. ; TROYANOVSKY, Sergey M. ; HOLLAND, Roland ; HAELST, Urbain J. G. M. van ; RAMAEKERS, Frans C. S.: Basal Cell-specific and Hyperproliferation-related Keratins in Human Breast Cancer. In: *American Journal of Pathology* 138 (1991), Nr. 3, S. 751–763
- [Wiche 1998] WICHE, Gerhard: Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. In: *Journal of Cell Science* 111 (1998), S. 2477–2486
- [Windoffer et al. 2006] WINDOFFER, Reinhard ; KÖLSCH, Anne ; WÖLL, Stefan ; LEUBE, Rudolf E.: Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. In: *The Journal of Cell Biology* 173 (2006), Nr. 3, S. 341–348
- [Windoffer et al. 2004] WINDOFFER, Reinhard ; WÖLL, Stefan ; STRNAD, Pavel ; LEUBE, Rudolf E.: Iden-

- tification of Novel Principles of Keratin Filament Network Turnover in Living Cells. In: *Molecular Biology of the Cell* 15 (2004), S. 2436–2448
- [Wöll et al. 2005] WÖLL, Stefan ; WINDOFFER, Reinhard ; LEUBE, Rudolf E.: Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems. In: *European Journal of Cell Biology* 84 (2005), S. 311–328
- [Wrone-Smith et al. 1995] WRONE-SMITH, Tamara ; JOHNSON, Timothy ; NELSON, Bruce ; BOISE, Lawrence H. ; THOMPSON, Craig B. ; NUÍEZ, Gabriel ; NICKOLOFF, Brian J.: Discordant Expression of Bcl-x and Bcl-2 by Keratinocytes in Vitro and Psoriatic Keratinocytes in Vivo. In: *American Journal of Pathology* 146 (1995), Nr. 5, S. 1079–1088
- [Wu et al. 2000] WU, Kenneth C. ; BRYAN, Janine T. ; MORASSO, Maria I. ; JANG, Shyh-Ing ; LEE, Jeung-Hoon ; YANG, Jun-Mo ; MAREKOV, Lyuben N. ; PARRY, David A. ; STEINERT, Peter M.: Coiled-Coil Trigger Motifs in the 1B and 2B Rod Domain Segments Are Required for the Stability of Keratin Intermediate Filaments. In: *Molecular Biology of the Cell* 11 (2000), Nr. 10, S. 3539–3558
- [Yamamoto und Nishioka 2003] YAMAMOTO, T. ; NISHIOKA, K.: Alteration of the Expression of Bcl-2, Bcl-x, Bax, Fas, and Fas Ligand in the Involved Skin of Psoriasis vulgaris following Topical Anthralin Therapy. In: *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 16 (2003), Nr. 50-58
- [Yang et al. 1999] YANG, Annie ; SCHWEITZER, Ronen ; SUN, Deqin ; KAGHAD, Mourad ; WALKER, Nancy ; BRONSONK, Roderick T. ; TABIN, Cliff ; SHARPE, Arlene ; CAPUT, Daniel ; CRUM, Christopher ; McKEON, Frank: p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. In: *Nature* 398 (1999), S. 714–718
- [Zatloukal et al. 2004] ZATLOUKAL, Kurt ; STUMPTNER, Conny ; FUCHSBICHLER, Andrea ; FICKERT, Peter ; LACKNER, Carolin ; TRAUNER, Michael ; DENK, Helmut: The keratin cytoskeleton in liver diseases. In: *Journal of Pathology* 204 (2004), S. 367–376

- [Zeeuwen 2004] ZEEUWEN, Patrick L. J. M.: Epidermal differentiation: The role of proteases and their inhibitors. In: *European Journal of Cell Biology* 83 (2004), S. 761–773
- [Zouboulis et al. 2008] ZOUBOULIS, C. C. ; ADJAYE, J ; AKAMATSU, H ; MOE-BEHRENS, G ; NIEMANN, C: Human skin stem cells and the ageing process. In: *Experimental Gerontology* 43 (2008), Nr. 11, S. 986–997
- [Zuliani et al. 2007] ZULIANI, Thomas ; OBRLOT, Hélène ; TUAL, Martine ; LACHMAN-WEBER, Nad  ge ; DUMAS, Marc ; FORMSTECHE, Pierre ; POLAKOWSKA, Renata ; RATINAUD, Marie-Hélène: Variable Bax antigenicity is linked to keratinocyte position within epidermal strata and UV-induced apoptosis. In: *Experimental Dermatology* 17 (2007), Nr. 125-132

## 14 Anhang

## 14.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 35: Verwendete Verbrauchsmaterialien

DMEM ohne Ca <sup>2+</sup>	Kalziumfreies Nährmedium	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM mit Ca <sup>2+</sup>	Kalziumhaltiges Nährmedium	Invitrogen (Karlsruhe)
Ham's F12	Nährmedium	Invitrogen (Karlsruhe)
Hydrocortison	Proliferationsfördernde Lösung	Riedel de Haën/Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Seelze)
ITSX	Proliferationsfördernde Lösung	Invitrogen (Karlsruhe)
rHu EGF (1 µg/µl)	rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor	Invitrogen (Karlsruhe)
Choleratoxin	Proliferationsfördernde Lösung	ListLab (Campbell, CA, USA)
FCS inaktiviert	fetales Kälberserum	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Antibiotika	Invitrogen (Karlsruhe)
HEPES (1 M)	Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
PBS <sup>-/-</sup>	Phosphatgepufferte Kochsalz- lösung ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA 0,5%	Dissoziationslösung	Invitrogen (Karlsruhe)
Accutase	Dissoziationslösung	PAA (Pasching, Österreich)
Paraformaldehyd	Fixierungslösung	Roth (Karlsruhe)
Natriumacid	Konservierungsmittel	Roth (Karlsruhe)
Methanol		Riedel de Haën/Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Seelze)
Aqua dest.		B. Braun (Melsungen)

## 14 Anhang

---

Iso Flow Sheath Fluid	Spüllösung für das Durchflusszytometer	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Cleaning and Rinse solution	Reinigungslösung für das Durchflusszytometer	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Einmalskalpelle (Nr. 11, 12, 15)		Feather (Osaka, Japan)
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>		Greiner Bio One (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup>		Greiner Bio One (Frickenhausen)
Zellkulturschalen 100mm		Greiner Bio One (Frickenhausen)
24 Well Zellkulturplatte kollagenbeschichtete		Greiner Bio One (Frickenhausen)
Zellkultureinsätze Nr. 3495		Corning (Corning, NY, USA)
konische PP-Teströhrchen 15 ml		Greiner Bio One (Frickenhausen)
konische PP-Teströhrchen 50 ml		Greiner Bio One (Frickenhausen)
50 µm Zellfilter		DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Reaktionsgefäße 1,5 ml		Sarstedt (Nümbrecht)
Sterican 0,90-25 mm		Braun (Melsungen)
Injekt Solo 2 ml Luer-Ansatz		Braun (Melsungen)
Pipettenansätze (2,5 µl, 10µl, 100 µl, 1000 µl)		Eppendorf (Hamburg)



## 14.2 Antikörper für Immunfärbung

Tabelle 37: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
Isotyp Kontrolle	ab18448	abcam (Cambridge, Grossbritannien)
Zytokeratin 2	ab16111-200	abcam (Cambridge, Grossbritannien)
Zytokeratin 10	ab9026	abcam (Cambridge, Grossbritannien)
Zytokeratin 14	ab9220	abcam (Cambridge, Grossbritannien)
Zytokeratin 17	M7046	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Zytokeratin 18	MA1-19048	Affinity BioReagents (Golden, CO, USA)
Zytokeratin 19	DLN-16593	Dianova (Hamburg)
Bax	DM 246-05	Acris Antibodies (Herford)
Bcl-x	AM00285 PU-N	Acris Antibodies (Herford)
Caspase 14	NB100-1868	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
FITC rabbit-anti-mouse	F0313	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
FITC goat-anti-rabbit	111-096-045	Dianova (Hamburg)

### 14.3 Apparate und Instrumente

Tabelle 38: Verwendete Apparate und Instrumente

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Reinraumwerkbank	HeraSafe	Heraeus (Hanau)
Gasbrenner	Gasprofi 1	WLD Tec (Göttingen)
Wasserbad	GFL 1083	GFL (Burgwedel)
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge	Megafuge 1.0 und 1.0R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge	EBA 12 R	Hettich (Tuttlingen)
Pipetten	Eppendorf Reference 2,5 / 10 / 100 / 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Inversmikroskop	Diaphot	Nikon (Düsseldorf)
Durchlichtmikroskop	Axiophot	Zeiss (Jena)
Glasflaschen	(50 ml, 200 ml, 500 ml)	Schott (Mainz)
Glasmesszylinder	(100 ml, 250 ml)	Schott (Mainz)
Glaspipetten	Techcolor (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Hirschmann (Eberstadt)
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Improved Bright Line	Labor Optik (Bad Homburg)
Durchflusszytometer	Cyan ADP Flow Cytometer	Dako (Glostrup, Dänemark)
Analyse Software	Summit V4.3.01	Dako (Glostrup, Dänemark)
TER-Messgerät	Millicell-ERS Volt-Ohm Meter	Millipore (Billerica, MA, USA)

## 15 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Henning Schaumburg

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**