

Gingival Fibroblasts Established on Microstructured Model Surfaces: Their Influence on Epithelial Morphogenesis and other Tissue-specific Cell Functions in a Co-cultured Epithelium

An In-Vitro Model

Gingivafibroblasten auf mikrostrukturierten Modell- oberflächen: Ihr Einfluss auf die Epithelmorphogenese und weitere gewebespezifische Zellfunktionen eines kokultivierten Epithels

Ein In-vitro-Modell

Eva Müssig^{1,2}, Pascal Tomakidi², Thorsten Steinberg²

Abstract

Objective: The objective of this study was to investigate how gingival fibroblasts cultured on microstructured model surfaces affect epithelial morphogenesis and other cell functions in a co-cultured epithelium while conducting a molecular analysis of interactions between biomaterials employing periodontal tissue cells.

Materials and Methods: We are the first to have successfully co-cultured gingival fibroblasts together with gingival keratinocytes on biofunctionalized, microstructured model surfaces and, in the resulting co-cultured epithelium, examined the molecules of tissue homeostasis, the differentiation marker keratin (K) 1/10, and involucrin after 1- and 2-week periods of cultivation. Desmoplakin was perceived as evidence of cell-to-cell contact and thus as proof of epithelial integrity. We also analyzed the basement membrane component laminin-5. The aforementioned co-culture model without gingival fibroblasts was used as a control set-up.

Results: On the protein level, indirect immunofluorescence demonstrated the presence of K1/10, involucrin and the basement membrane component laminin-5 in the co-cultured epithelium in both culture periods. Furthermore, we observed that these epithelial markers had become re-oriented toward the suprabasal cell layers which, in turn, reflects the native in-vivo gingival

Zusammenfassung

Zielsetzung: Zur molekularen Analyse der Interaktionen von prospektiv zur Anwendung kommenden Biomaterialien mit Zellen parodontaler Gewebe sollte der Einfluss von Gingivafibroblasten, die auf mikrostrukturierten Modelloberflächen kultiviert wurden, auf die Epithelmorphogenese und weitere Zellfunktionen eines kokultivierten Epithels untersucht werden.

Material und Methoden: Erstmals wurden Gingivafibroblasten zusammen mit Gingivakeratinozyten auf biofunktionalisierten mikrostrukturierten Modelloberflächen etabliert und im daraus resultierenden kokultivierten Epithel Moleküle der Gewebshomöostase, die Differenzierungsmarker Keratin (K) 1/10 sowie Involucrin nach 1 und 2 Wochen Kultivierungszeit, untersucht. Desmoplakin diente zum Nachweis von Zell-Zell-Kontakten und damit zum Nachweis der Epithelintegrität. Weiterhin wurde die Basalmembrankomponente Laminin-5 analysiert. Als Kontrolle diente das oben beschriebene Kultivierungsmodell ohne die Verwendung von Gingivafibroblasten.

Ergebnisse: Auf Proteinebene zeigte im kokultivierten Epithel die indirekte Immunfluoreszenz die Präsenz von K1/10, Involucrin und der Basalmembrankomponente Laminin-5 zu beiden Kultivierungszeitpunkten. Des Weiteren konnte eine Reorientierung dieser epithelialen Marker in Richtung der suprabasalen Zellschichten beobachtet werden, was wiederum die In-vivo-Situation eines nativen Gingivaepithels widerspiegelt. Zell-Zell-Kontakte konnten über Desmoplakin bereits nach 1 Woche nachge-

¹ Department of Orthodontics, Albert Ludwig University, Freiburg, Germany,

² Department of Oral Biotechnology, Albert Ludwig University, Freiburg, Germany.

Received: March 19, 2009; accepted: July 6, 2009

J Orofac Orthop 2009;70:351–62

DOI 10.1007/s00056-009-0905-z

epithelium. We identified cell-to-cell adhesion as a function of desmoplakin after just 1 week. In the mRNA analysis using quantitative RT-PCR after 2 weeks of cultivation, we noted a considerable rise in relative gene expression that was time-dependent for the early keratinocyte differentiation marker K1 and late marker involucrin.

Conclusions: Our findings demonstrate that gingival fibroblasts on microstructured model surfaces are vitally important for tissue-specific cell functions such as epithelial morphogenesis and other biological cell functions such as differentiation and epithelial integrity. These study findings can thus contribute to the optimization and/or new development of biomaterials currently used in dental medicine.

Key Words: Microstructured model surfaces · Periodontium · Co-culture

Introduction

To understand how prospective biomaterials interact with periodontal tissue cells in dental medicine, it is important to analyze such interactions on the molecular level. Microstructured model surfaces are especially suitable for studies of this type, because they provide specific environmental parameters upon which various cell types can be cultured. Studies of changes in cell functions in monolayer cell cultures on microstructured model surfaces have shown that the extracellular environment exerts a decisive influence on gingival keratinocytic cell functions [17]. In addition to the monolayers as simple cell systems, the complex co-culture models currently available also enable us to approximate the in-vivo situation whereby two different periodontal cell types interact with each other [11].

Interactions between fibroblasts and keratinocytes are indispensable for epithelial homeostasis [2]. Homeostasis and hence the balance between proliferation and differentiation is maintained by the influence of various molecules known as growth factors [22]. Co-cultures in which two different cell types (such as periodontal ligament fibroblasts and alveolar bone osteoblasts or, as in this study, gingival fibroblasts and gingival keratinocytes) are cultured together, providing a model which ultimately makes such interactions possible, thus closely approximating the in-vivo situation [10, 11].

The intermediate filament protein keratin (K) 1 can serve as a suitable marker for analyzing early keratinocyte differentiation [6]. In the oral cavity, the suprabasal cells of the keratinized epithelium of the gingiva and hard palate express K1 and K10, but small quantities of K1 and K10 can also be found in the non-keratinized oral epithelium [1, 6]. Involucrin, a component of the "cornified envelope", a protein envelope sheathing the inner face of the keratinocyte membrane

wiesen werden. In der mRNA-Analyse wurde für den frühen Keratinozytendifferenzierungsmarker K1 und den späten Marker Involucrin mit Hilfe der quantitativen RT-PCR nach 2 Wochen Kultivierung ein prägnanter zeitabhängiger Anstieg der relativen Genexpression beobachtet.

Schlussfolgerungen: Die Befunde zeigen, dass Gingivafibroblasten auf mikrostrukturierten Modelloberflächen für die gewebespezifischen Zellfunktionen wie die Epithelmorphogenese sowie weitere biologische Zellfunktionen wie die Differenzierung und die epitheliale Integrität von essentieller Bedeutung sind. Somit können die in dieser Untersuchung gezeigten Befunde zur Optimierung oder Neuentwicklung von in der Zahnheilkunde zur Anwendung kommenden Biomaterialien beitragen.

Schlüsselwörter: Mikrostrukturierte Modelloberflächen · Parodont · Kokultur

Einleitung

Zum Verständnis der Interaktionen von prospektiven zur Anwendung kommenden Biomaterialien in der Zahnheilkunde mit Zellen der parodontalen Gewebe ist die Analyse dieser Wechselwirkungen auf molekularem Niveau entscheidend. Für diese Art von Untersuchungen eignen sich besonders mikrostrukturierte Modelloberflächen, die definierte Umgebungsparameter zur Verfügung stellen, auf denen sich unterschiedliche Zelltypen etablieren lassen. In Untersuchungen über Veränderungen der Zellfunktionen von Monolayer-Zellkulturen auf mikrostrukturierten Modelloberflächen konnte bereits gezeigt werden, dass die extrazelluläre Umgebung einen entscheidenden Einfluss auf die Zellfunktionen von Gingivakeratinozyten hat [17]. Neben Monolayern als einfache Zellsysteme ermöglichen in diesem Kontext jetzt auch die zur Verfügung stehenden komplexen Kokulturmodelle eine Annäherung an die In-vivo-Situation, in denen zwei unterschiedliche parodontale Zelltypen miteinander interagieren [11].

Für die epitheliale Homöostase sind die Interaktionen von Fibroblasten mit Keratinozyten unabkömmlich [2]. Die Homöostase und damit die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung wird durch den Einfluss unterschiedlicher Moleküle, sogenannter Wachstumsfaktoren, aufrechterhalten [22]. Kokulturen, in denen zwei unterschiedliche Zelltypen, wie Parodontalligamentfibroblasten und Osteoblasten des Alveolarknochens oder wie in dieser Arbeit, Gingivafibroblasten und Gingivakeratinozyten zusammen kultiviert werden, liefern dabei ein Modell, die solche Interaktionen erst ermöglichen, und damit der In-vivo-Situation sehr nahe kommen [10, 11].

Zur Analyse der frühen Keratinozytendifferenzierung kann das Intermediärfilamentprotein Keratin (K) 1 als ein ge-

during terminal differentiation, is a marker of late keratinocytic differentiation [9, 11, 20]. Another decisive factor is attachment to the basement membrane to ensure epithelial integrity, as well as the intercellular contacts made possible in part by desmoplakin, a molecule of the plakin family [9, 13]. Laminin-5 is an extraordinarily important component in that function which, as a heterotrimer, constitutes the anchoring filaments of the lamina lucida, essential for the keratinocytes' adhesion to the basement membrane [7, 15].

To make cells adhere to the surfaces, the latter must first be biofunctionalized, a state achievable with fibronectin, an extracellular molecule [4, 5, 12, 17, 18]. In regenerative medicine, fibronectin is used to biofunctionalize membranes to promote the healing process [16]. Furthermore, there are experimental animal studies and in-vitro investigations on coating titanium implants with fibronectin [8, 14].

Since gingival fibroblasts have a decisive influence on epithelial morphogenesis of the gingival epithelium [2], the objective of this study was to examine their influence on a co-cultured epithelium using a co-culture model consisting of gingival fibroblasts and gingival keratinocytes. In the process, and for the first time, our study design called for a specific microstructured model to be used as a co-culture substrate, and gingival fibroblasts were pre-cultivated on them. In addition, these specific new cell-culture substrates would allow us to observe biological cell functions on a co-cultured epithelium under certain environmental conditions. As a biological "read out" in this process, the cell functions were analyzed while considering epithelial morphogenesis, differentiation and epithelial integrity.

Materials and Methods

Manufacture of Microstructured Model Surfaces

Microstructured model surfaces can be generated by polymerizing the silicone derivate polydimethylsiloxane (PDMS; Dow Corning, Wiesbaden, Germany) using a silicone wafer made by a photolithographic process. When the silicone wafer coated with photoresistent lacquer is exposed to UV-light through a chrome mask, little holes are created into which the silicone derivate is poured and is then polymerized. After the polymerized substrate is removed, the model surface is covered by elastic pillars. The pillars are small posts of variable diameter (in this case 5 µm) and varying interspaces (5–11 µm, in this case, 9 µm) (Figure 1a) [17].

Co-culture Generation on Microstructured Model Surfaces

First, the model surfaces were biofunctionalized with the extracellular matrix molecule fibronectin (1 mg/ml; working dilution: 1:100; Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany). The PDMS surface's hydrophobic characteristics and the pillars' arrangement make it possible via the "lotus" effect (Figure 1b) that biofunctionalization and thus

eigneter Marker herangezogen werden [6]. In der Mundhöhle exprimieren die suprabasalen Zellen des keratinisierten Epithels der Gingiva und des harten Gaumens K1 und K10, jedoch sind auch im nicht keratinisierten oralen Epithel geringe Mengen von K1 und K10 nachweisbar [1, 6]. Involucrin, ein Bestandteil des so genannten „cornified envelope“, einer Proteinhülle, die die Keratinozytenmembran während der Terminaldifferenzierung von innen ummantelt, stellt einen Marker der späten Keratinozytendifferenzierung dar [9, 11, 20]. Bezüglich der Epithelintegrität ist neben den interzellulären Kontakten, die unter anderem durch ein Molekül der Plakinfamilie, nämlich Desmoplakin, gewährleistet wird [9, 13], auch die Verbindung zur Basalmembran entscheidend. Dabei stellt Laminin-5 eine äußerst wichtige Komponente dar, die als Heterotrimer die Verankerungsfilamente der Lamina lucida der Basalmembran konstituiert und essentiell für die Adhäsion der Keratinozyten an der Basalmembran ist [7, 15].

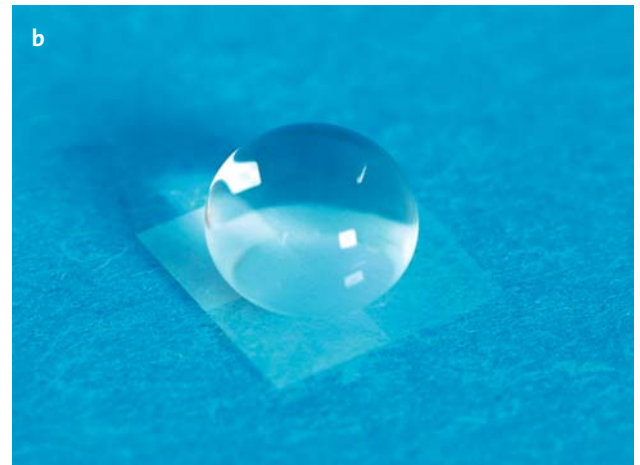
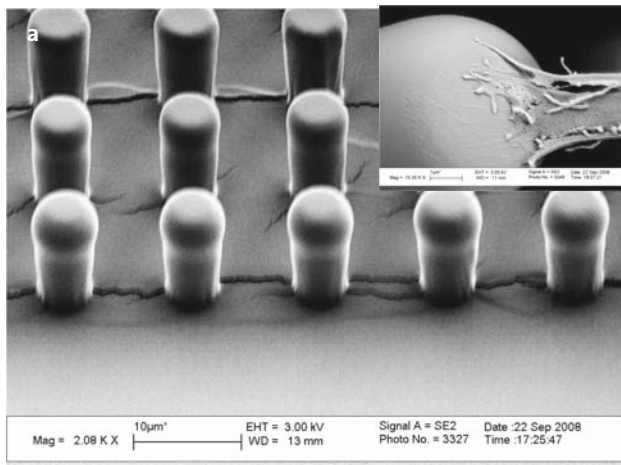
Um eine Zelladhäsion auf den Oberflächen zu ermöglichen, müssen die Oberflächen zunächst biofunktionalisiert werden, was durch das Extrazellulärmatrixmolekül Fibronectin realisiert werden kann [4, 5, 12, 17, 18]. In der regenerativen Medizin wird Fibronectin zur Biofunktionalisierung von Membranen eingesetzt, um den Heilungsprozess zu begünstigen [16]. Darüber hinaus liegen tierexperimentelle Studien und In-vitro-Untersuchungen über die Beschichtung von Titanimplantaten mit Fibronectin vor [8, 14].

Da Gingivafibroblasten einen entscheidenden Einfluss auf die Epithelmorphogenese des Gingivaepithels haben [2], war es Ziel dieser Untersuchung, mit Hilfe eines aus Gingivafibroblasten und Gingivakeratinozyten bestehenden Kokulturmodells, den Einfluss dieser Fibroblasten auf ein kokultiviertes Epithel zu untersuchen. Dabei sollten erstmalig definierte mikrostrukturierte Modelloberflächen als Kokultursubstrat verwendet und auf ihnen die Gingivafibroblasten vorkultiviert werden. Des Weiteren sollten diese neuartigen definierten Zellkultursubstrate die Möglichkeit bieten, biologische Zellfunktionen eines kokultivierten Epithels unter definierten Umgebungsbedingungen zu untersuchen. Als biologischer „Read Out“ wurden hierbei Zellfunktionen analysiert, die die Epithelmorphogenese, die Differenzierung sowie die epitheliale Integrität berücksichtigen.

Material und Methoden

Herstellung mikrostrukturierter Modelloberflächen

Mikrostrukturierte Modelloberflächen können durch Polymerisation des Silikonderivates Polydimethylsiloxan (PDMS; Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland) mit Hilfe einer Schablone, die in einem fotolithografischen Verfahren hergestellt wird, generiert werden. Durch Belichtung eines mit Fotolack beschichteten Siliziumrohrlings durch eine Chrommaske entstehen in definierten Abständen Vertiefungen, in die das Silikonderivat gegossen und anschließend unter Hitze auspolymerisiert wird. Nach Abziehen des ausgehärteten Substrates erhält man eine Modellober-



Figures 1a and 1b. (a) Microstructured PDMS-model surface (scanning electron microscopic image – SEM); inset: fibroblast adhesion on the top of the pillar head which has been biofunctionalized with fibronectin (SEM). (b) Drop of a fibronectin solution for biofunctionalizing a microstructured PDMS-model surface. The surface displays hydrophobic characteristics (the “lotus” effect).

Abbildungen 1a und 1b. (a) Mikrostrukturierte Modelloberfläche aus PDMS (rasterelektronenmikroskopische Aufnahme – REM); Insert: Adhäsion eines Fibroblasten auf dem mit Fibronectin biofunktionalisierten Pillarkopf (REM). (b) Tropfen einer Fibronectinlösung zur Biofunktionalisierung einer mikrostrukturierten Modelloberfläche aus PDMS. Die Oberfläche zeigt hydrophobe Eigenschaften (Lotuseffekt).

the adhesion of the fibroblasts occurs only on the tops of the pillars (inset Figure 1a).

After biofunctionalization, human gingival fibroblasts with a cell number of $1 \times 10^5/\text{ml}$ were seeded on the pillar surface, and the cells were precultured in the incubator for 2 days on the surfaces in DME medium (PAA, Pasching, Austria) with 10% FCS (Seromed, Biochrom, Berlin, Germany), 200 mM glutamine (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe, Germany), and 50 mg/ml (500 $\times$) kanamycin (Roche, Mannheim, Germany). After confluence of the fibroblasts, a collagen I gel (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany) was applied to the surfaces colonized by fibroblasts on which immortalized human gingival keratinocytes were seeded in the same cell number, and the generated co-culture was cultured in FAD medium (DME medium and Ham's F12 medium [Biochrom, Berlin, Germany] at a ratio of 3:1 with 5% FCS. Further additives were [all by Promocell, Heidelberg, Germany]: 0.4 mg/ml hydrocortisone, 8.33 mg/ml choleratoxine, 5.0 mg/ml insulin, 18.2 mg/ml adenine, 10.0 mg/ml EGF). Due to the limited life span of primary keratinocytes, immortalization makes it possible to generate a permanent “pool” of cells capable of proliferation. Since their differentiation pattern corresponds to that of the original tissue [11], they are suitable for gene- and protein-expression analyses. The co-culture generated in this way was cultivated for 1 and 2 weeks. The gingival fibroblasts came from healthy gingival tissue that had been removed during routine dental surgery. The immortalized human gingival keratinocytes we used are an established cell line. Tissue removal and the use of human gingival tissue samples were approved by the Ethics

fläche mit elastischen Pillaren. Die Pillare sind kleine Pfosten, die mit variablem Durchmesser (hier 5 μm) und unterschiedlichen Abständen zueinander (5–11 μm , hier: 9 μm) konfiguriert werden können (Abbildung 1a) [17].

Generierung einer Kokultur auf mikrostrukturierten Modelloberflächen

Zunächst wurden die Modelloberflächen mit dem Extrazellulärmatrixmolekül Fibronectin (1 mg/ml; Arbeitslösung: 1:100; Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) biofunktionalisiert. Die hydrophoben Eigenschaften der PDMS-Oberfläche und die Anordnung der Pillare machen es durch den sogenannten Lotuseffekt (Abbildung 1b) möglich, dass die Biofunktionalisierung und damit auch die Adhäsion der Fibroblasten ausschließlich auf den Pillarköpfen gewährleistet ist (Insert Abbildung 1a).

Nach der Biofunktionalisierung wurden humane Gingivafibroblasten mit einer Zellzahl von $1 \times 10^5/\text{ml}$ auf der Pillaroberfläche ausgesät und die Zellen im Brutschrank für 2 Tage auf den Oberflächen im DME-Medium (PAA, Pasching, Österreich, mit 10% FCS (Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland), 200 mM Glutamin (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe, Deutschland), und 50 mg/ml (500 $\times$) Kanamycin (Roche, Mannheim, Deutschland) vorkultiviert. Nach der Konfluenz der Fibroblasten wurde ein Kollagen-I-Gel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) auf die mit Fibroblasten kultivierten Oberflächen aufgebracht, darauf immortalisierte humane Gingivakeratinozyten in gleicher Zellzahl ausgesät und die generierte Kokultur in FAD-Medium kultiviert (DME-Medium und Ham's F12-Medium

Committee of the Medical Faculty University of Heidelberg (vote No. 148/2003; renewal: 30 September 2005).

For gene transcription analyses, keratinocytes and fibroblasts grew spatially separated from each other in the Transwell system. The fibroblasts were seeded on a model surface on the bottom of a 24-well plate (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany), and the keratinocytes were cultured for 1 and 2 weeks in filter inserts in the plate's wells.

No fibroblasts were seeded on the model surfaces of the controls. Other steps taken with the controls were, however, identical to the aforementioned experimental approach.

Analyses

To evaluate the morphology of the fibroblasts grown on the surfaces and the co-cultured epithelium, we first dehydrated the fibroblasts by rinsing them through graded ethanol and water mixtures, subjected them to critical-point drying (critical-point drier, Balzers CPD 030; Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) for 2 min. at 6 mA sputtered with gold (Sputter Balzers SLD, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) and observed them under the scanning electron microscope (SEM; Amray Inc., Bedford, MA, USA).

To prove epithelium-specific cell functions on an mRNA level, we analyzed the relative gene expression for the early keratinocyte differentiation marker K1 and the late differentiation marker involucrin using quantitative RT-PCR after isolating the RNA (RNeasy mini kit; Qiagen, Hilden, Germany) and after culture periods of 1 and 2 weeks. The concentration and integrity of the RNA was determined (Experion™ BioRad, Munich, Germany), the cDNA synthesized (RevertAid™, reverse transcription protocol; Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), the cDNA concentration measured (Pico Green; Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and PCR carried out in the iCycler (BioRad laboratories, Philadelphia, PA, USA). To reveal the markers in PCR, we used commercial primers (Superarray, Frederick, MD, USA). Relative mRNA gene expression was analyzed with the $\Delta\Delta C_T$ equation, and data was calculated using the Gene Expression Macro Software provided with the iCycler; the data was then normalized against the C_T of the non-modulated housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Epithelial cell functions on the protein level were analyzed by indirect immunofluorescence (IIF). To obtain evidence in the IIF, we froze the co-cultured epithelium (embedded in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands)) in liquid nitrogen. The 10 μ m-thick frozen sections were mounted on adhesive slides (Histobond, Marienfeld, Germany) and fixed in ice-cold, 80% methanol and acetone (5 min. each). The following markers were used in the IIF as epithelial specific markers: the early keratinocyte differentiation marker keratin (K) 1/10 (mouse monoclonal; Acris, Hiddenhausen, Germany; working dilution 1:50), the late differentiation marker involucrin (mouse monoclonal; Ab-

[Biochrom, Berlin, Deutschland] im Verhältnis 3:1 mit 5% FCS. Weitere Zusätze [alle Promocell, Heidelberg, Deutschland]: 0,4 mg/ml Hydrokortison, 8,33 mg/ml Choleratoxin, 5,0 mg/ml Insulin, 18,2 mg/ml Adenin, 10,0 mg/ml EGF). Aufgrund der limitierten Überlebensrate von primären Keratinozyten besteht durch Immortalisierung die Möglichkeit, einen permanenten „Pool“ teilungsfähiger Zellen zu generieren. Da deren Differenzierungsmuster immer noch dem des Ausgangsgewebes entspricht [11], sind sie für Genexpressions- und Proteinexpressionsanalysen geeignet. Die so generierte Kokultur wurde für 1 und 2 Wochen kultiviert. Die Gingivafibroblasten entstammten gesundem Gingivagewebe, das im Rahmen von zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen entnommen wurde. Die verwendeten immortalisierten humanen Gingivakeratinozyten stellen eine bereits etablierte Zelllinie dar. Die Gewebeentnahme und Verwertung der humanen Gingivagewebeproben wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg genehmigt (Votum Nr. 148/2003; Erneuerung: 30.09.2005).

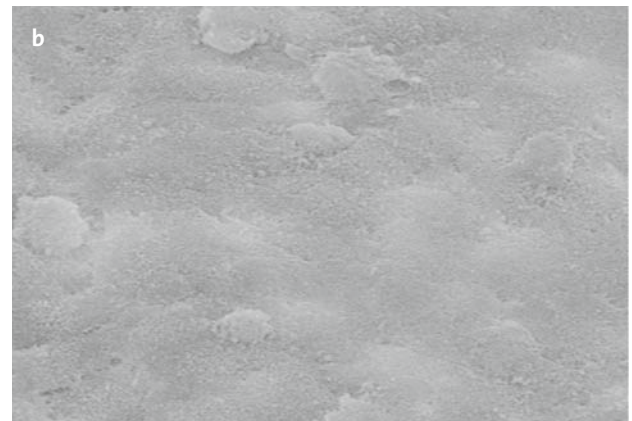
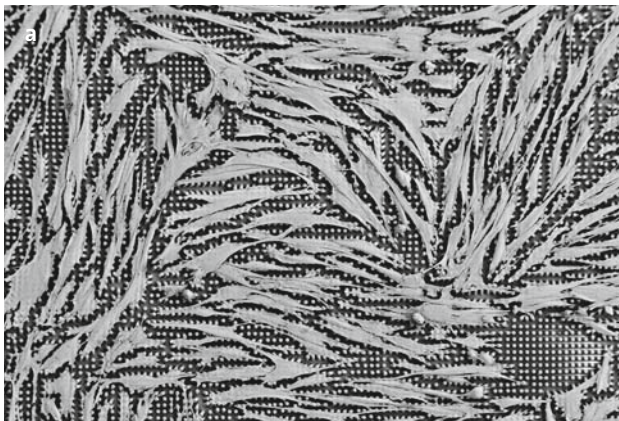
Für den Nachweis der Gentranskription wuchsen Keratinozyten und Fibroblasten räumlich getrennt voneinander im Transwell-Verfahren. Die Aussaat der Fibroblasten erfolgte auf einer Modelloberfläche auf dem Boden einer 24-Well-Platte (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland), die Keratinozyten wurden in Filterinserts, die in die Wells der Platte eingehängt wurden, für den Zeitraum von 1 und 2 Wochen kultiviert.

Im Kontrollansatz wurde auf das Aussäen von Fibroblasten auf den Modelloberflächen verzichtet. Das weitere Vorgehen glich dem vorher beschriebenen Versuchsansatz.

Nachweismethoden

Zur Beurteilung der Morphologie der auf den Oberflächen gewachsenen Fibroblasten sowie des kokultivierten Epithels wurden die Fibroblasten zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, einer kritischen Punkttrocknung (Kritisch-Punkt-Trockner, Balzers CPD 030; Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) unterzogen, 2 Min. bei 6 mA mit Gold besputtert (Sputter Balzers SLD, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) und im Rasterelektronenmikroskop (REM; Amray Inc., Badford, MA, USA) dargestellt.

Für den Nachweis epithelspezifischer Zellfunktionen auf mRNA-Ebene wurde nach Isolierung der RNA (RNeasy mini kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Kultivierungszeitraum von 1 und 2 Wochen die relative Genexpression für den frühen Keratinozytendifferenzierungsmarker K1 und den späten Differenzierungsmarker Involucrin mittels der quantitativen RT-PCR analysiert. Die Konzentration und die Integrität der RNA wurde bestimmt (Experion™ BioRad, München, Deutschland), die cDNA synthetisiert (RevertAid™, reverse transcription protocol; Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), die cDNA-Konzentration gemessen (Pico Green; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und die PCR im iCycler durchgeführt (BioRad laboratories,



Figures 2a and 2b. SEM images: (a) Gingival fibroblasts of the co-culture after 2 weeks on a biofunctionalized model surface; (b) keratinocytes of the co-culture after 2 weeks: the cell-to-cell contacts of the keratinocytes are barely discernable. These results are from three independent experiments.

Abbildungen 2a und 2b. REM-Aufnahmen: (a) Gingivafibroblasten der Kokultur nach 2 Wochen auf einer biofunktionalisierten Modelloberfläche; (b) Keratinozyten der Kokultur nach 2 Wochen Kultivierung: Die Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten lassen sich kaum mehr diskriminieren. Die Ergebnisse entstammen von drei unabhängigen Experimenten.

cam, Cambridge, United Kingdom; working dilution 1:200), the marker for cell-cell contacts desmoplakin (mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; working dilution 1:10) as well as laminin-5, a basement membrane marker (mouse monoclonal; Progen, Heidelberg, Germany; working dilution 1:50). The frozen sections were incubated overnight with primary antibody. The antibodies were dissolved in PBS with 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) and 12% bovine serum albumin (BSA; Serva, Heidelberg, Germany). We incubated the secondary fluorochrome-conjugated antibody at room temperature for 1 hour (Alexa FluorTM 488; MoBiTec, Göttingen, Germany; IgG (H+L) goat anti-mouse; for K1/10, laminin-5, desmoplakin working dilution 1:50; for involucrin working dilution 1:100). The nuclei were stained with propidium iodide (Sigma, Deisenhofen, Germany; working dilution 1:1000). The images were made after embedding in mounting medium (Biomedica, Foster City, CA, USA) using a confocal laser-scanning microscope (FITC-TRITC-Filter, Leica TCS/NT; Leica, Bensheim, Germany).

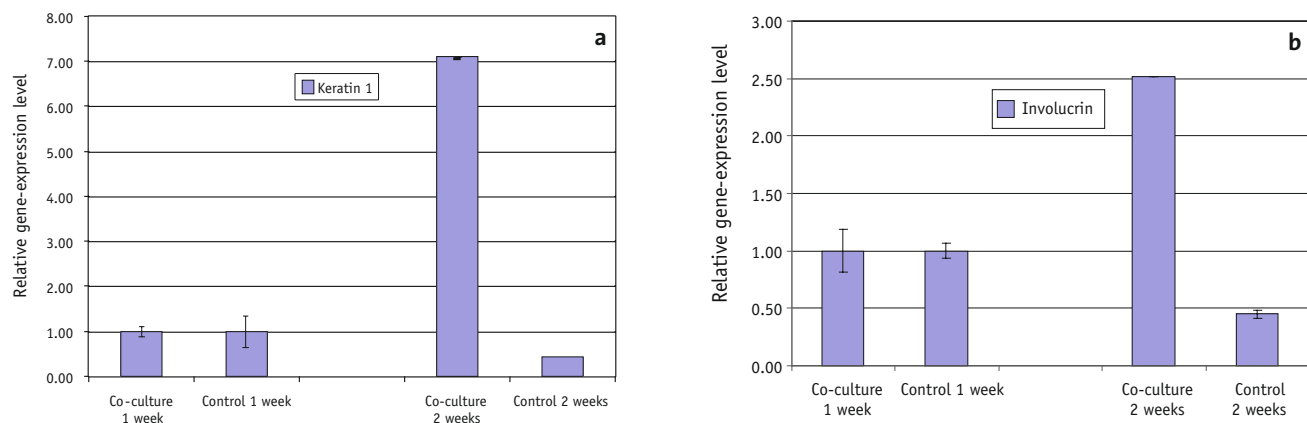
Results

Morphology of the Mesenchymal and Epithelial Compartment of the Co-culture

After a cultivation period of 2 weeks, scanning electron microscopy (SEM) revealed a nearly confluent grown cell layer of gingival fibroblasts on the model surface (Figure 2a). Regarding the keratinocytes in the co-culture, there were scarcely any cell-to-cell contacts visible after 2 weeks, which indicated that the keratinocytes in the apical epithelial region were differentiated in a manner similar to the in-vivo situation forming a flattened stratum corneum in the SEM image (Figure 2b).

Philadelphia, PA, USA). Für den Nachweis der Marker in der PCR wurden kommerzielle Primer verwendet (Superarray, Frederick, MD, USA). Die relative mRNA-Genexpression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Gleichung ermittelt. Die Daten wurden mit der vom Hersteller des iCyclers gelieferten Gen-Expressions-Macro-Software berechnet und gegen den C_T -Wert des nicht modulierten Haushaltsgenes Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase (GAPDH) abgeglichen.

Die Analyse der epithelialen Zellfunktionen auf Proteinebene erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF). Für den Nachweis in der IIF wurde das kokultivierte Epithel in flüssigem Stickstoff in eine Einbettmasse gebettet (Tissue Tek; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande). Die anschließend gefertigten 10 µm dicken Gefrierschnitte wurden auf Adhäsiv-Objektträger (Histobond, Marienfeld, Deutschland) aufgeschmolzen und für jeweils 5 min in eiskaltem 80%igem Methanol und Aceton fixiert. Für den Nachweis epithelspezifischer Marker fanden in der IIF folgende Marker Verwendung: die frühen Keratinozytendifferenzierungsmarker Keratin (K) 1/10 (Maus monoklonal; Acris, Hiddenhausen, Deutschland; Arbeitslösung 1:50), der späte Differenzierungsmarker Involucrin (Maus monoklonal; Abcam, Cambridge, United Kingdom; Arbeitslösung 1:200), der Marker für Zell-Zell-Kontakte Desmoplakin (Maus monoklonal; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland; Arbeitslösung 1:10) sowie der Basalmembranmarker Laminin-5 (Maus monoklonal; Progen, Heidelberg, Deutschland; Arbeitslösung 1:50). Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht. Die Antikörper waren in PBS gelöst mit 0,01% Tween-20 (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) und 12% bovinem Serum Albumin (BSA; Serva, Heidelberg, Deutschland). Die Inkubation des fluorochromgekoppelten Zweitantikörpers erfolgte bei Raumtemperatur für 1 Stunde (Alexa FluorTM



Figures 3a and 3b. Relative gene expression level of the early keratinocyte differentiation marker K1 (a) and late marker involucrin (b) in the co-cultured epithelium and in the control set-up after 1 and 2 weeks. The relative expression level was analyzed using a modification of the $\Delta\Delta C_T$ equation; data were calculated using the Gene Expression Macro Software provided with the iCycler; data were normalized against the C_T of the non-modulated housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The data reflect the means of three independent experiments.

Abbildungen 3a und 3b. Relative Genexpressionslevel des frühen Keratinozytendifferenzierungsmarkers K1 (a) und des späten Markers Involucrin (b) im kokultivierten Epithel und in der Kontrolle nach 1 und 2 Wochen. Die Analyse der relativen Expressionslevel erfolgte durch die modifizierte $\Delta\Delta C_T$ -Gleichung; die Daten wurden mit der vom Hersteller des iCyclers gelieferten Gen-Expression-Macro-Software berechnet; die Daten wurden mit dem C_T des nicht modulierten Haushaltsgens Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) abgeglichen. Die Ergebnisse entstammen drei unabhängigen Experimenten.

Cell Functions of the Co-cultured Epithelium

The influence of gingival fibroblasts cultured on the surfaces of the differentiated co-cultured epithelium became clear in the analysis of the relative gene expression of K1, which showed a drastic, 7-fold increase in expression when comparing 1 and 2 weeks. In the control set-up, whereby the keratinocytes were cultured at the identical time points without fibroblasts, comparison revealed even less of a decrease in K1 gene expression (Figure 3a).

A 2.5-fold increase in the relative gene expression level of involucrin became obvious on day 14. The control set-up showed no change in involucrin between 1 and 2 weeks of culture (Figure 3b).

Analysis of the cell functions of the co-cultured epithelium on the protein level was done using indirect immunofluorescence, which revealed a time-dependent increase in K1/10 expression when comparing 1 and 2 weeks (Figures 4a and 4b), in which K1 correlates with the gene expression from the quantitative RT-PCR. After 1 week, involucrin showed a consistently sparse, irregular distribution of protein expression (Figure 4c), while at the later 2-week cultivation time point, we noted that the protein expression on the terminally-differentiated upper cell layers tended to resemble that under in-vivo conditions (Figure 4d). In the control set-up it was striking that K1/10 protein expression was generally low (inset, Figure 4b), and that involucrin appeared less clear than in the co-culture, similar to in-vivo conditions (inset, Figure 4d).

The maintenance of stable epithelial integrity provided by intercellular contacts is crucial for differentiation. In the co-cultured epithelium of our co-culture, the presence of

488, MoBiTec, Göttingen, Deutschland; IgG (H+L) Ziege Anti-Maus; für K1/10, Laminin-5, Desmoplakin Arbeitslösung 1:50; für Involucrin Arbeitslösung 1:100). Die Kernfärbung erfolgte mit Propidiumjodid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Arbeitslösung 1:1000). Die Aufnahmen wurden nach dem Einbetten in Medium (Biomedica, Foster City, CA, USA) an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (FITC-TRITC-Filter; Leica TCS/NT; Leica, Bensheim, Deutschland) durchgeführt.

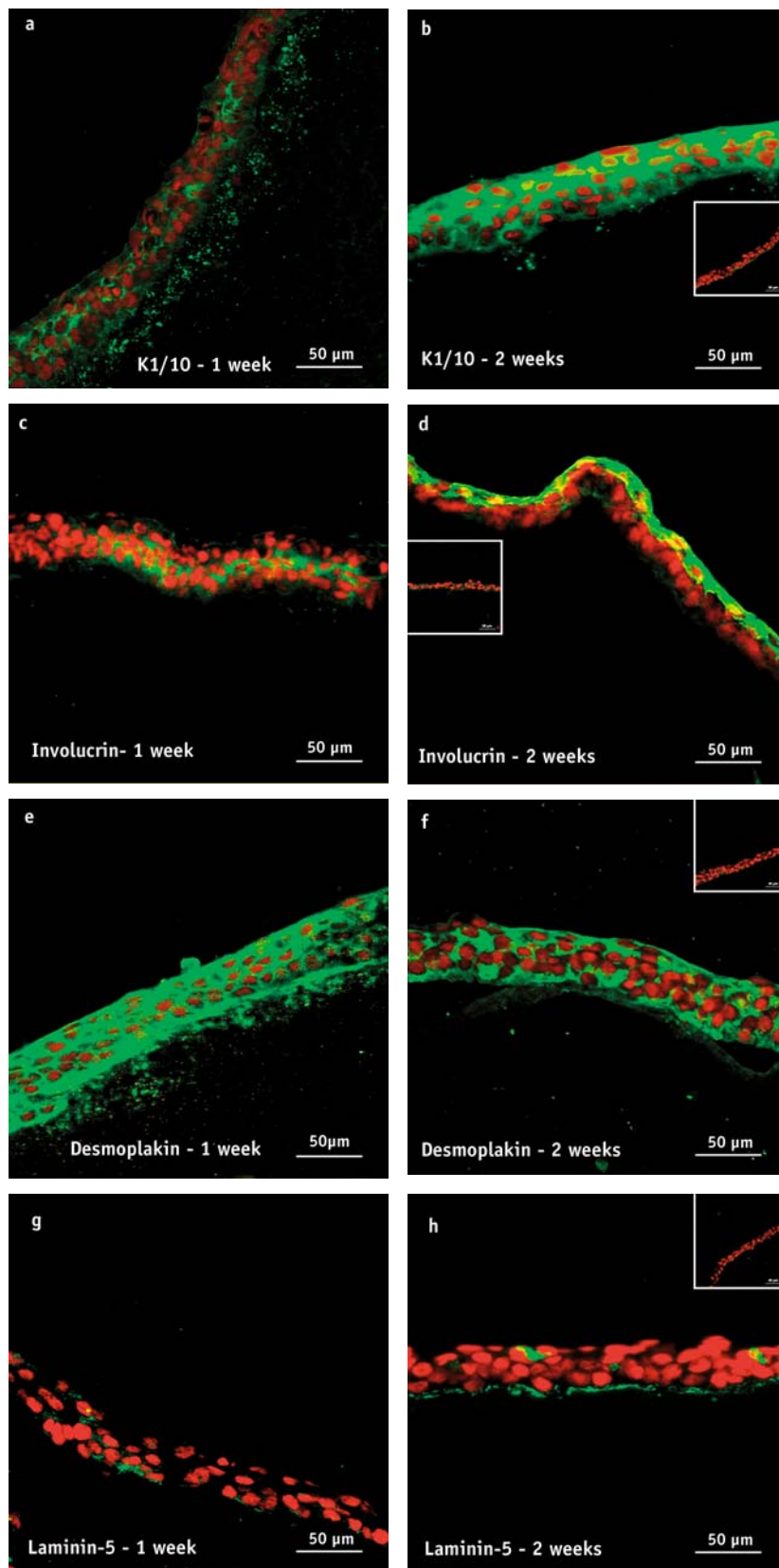
Ergebnisse

Morphologie des mesenchymalen und epithelialen Kompartimentes der Kokultur

Nach einem Kultivierungszeitraum von 2 Wochen konnte mittels der Rasterelektronenmikroskopie (REM) ein nahezu konfluent gewachsener Zellrasen von Gingivafibroblasten auf der Modelloberfläche dargestellt werden (Abbildung 2a). Bei den Keratinozyten der Kokultur waren nach 2 Wochen kaum mehr Zell-Zell-Kontakte zu diskriminieren, was darauf hindeutete, dass die Keratinozyten im apikalen Epithelbereich sich ähnlich der In-vivo-Situation differenzieren und ein abgeflachtes, in der REM glatt erscheinendes Stratum corneum ausbilden (Abbildung 2b).

Zellfunktionen des kokultivierten Epithels

Der Einfluss der auf den Oberflächen etablierten Gingivafibroblasten auf die Differenzierung des kokultivierten Epithels wurde in der Analyse der relativen Genexpression für den frühen Keratinozytendifferenzierungsmarker K1, der einen drastischen Anstieg der Expression beim Vergleich von 1 und 2 Wochen um das etwa Siebenfache zeigte, deutlich. In



Figures 4a to 4h. Indirect immunofluorescence of the co-cultured epithelium after 1 and after 2 weeks for the early keratinocyte differentiation marker K1/10 (a, b), the late differentiation marker involucrin (b, c), the marker demonstrating cell-to-cell contacts, desmoplakin (e, f) as well as the basement membrane marker laminin-5 (g, h). To allow for total nuclei counterstaining, propidium iodide was added (shown in red). The bars correspond to 50 µm. What was striking was the increased expression of K1/10 after 2 weeks (b), the cell-to-cell contacts existing after just 1 week (desmoplakin) (e), involucrin's (d) and laminin-5's (h) in-vivo-like pattern at the later culture time point of 2 weeks. Absence or marginal presence of those markers and low degree of stratification in the control epithelia after 2 weeks (inset b, d, f, h). These data reflect the means of three independent experiments.

Abbildungen 4a bis 4h. Indirekte Immunfluoreszenz des kokultivierten Epithels jeweils nach 1 und nach 2 Wochen für die frühen Keratinozytendifferenzierungsmarker K1/10 (a, b), den späten Differenzierungsmarker Involucrin (b, c), den Marker zum Nachweis von Zell-Zell-Kontakten Desmoplakin (e, f) sowie den Basalmembranmarker Laminin-5 (g, h). Die Kernfärbung erfolgte mit Propidiumjodid (rot dargestellt). Die Balken entsprechen 50 µm. Auffallend war die verstärkte Expression von K1/10 nach 2 Wochen (b), die bereits nach 1 Woche vorhandenen Zell-Zell-Kontakte (Desmoplakin) (e), die in-vivo-ähnliche Zonierung von Involucrin (d) sowie Laminin-5 (h) zum späteren Kultivierungszeitpunkt von 2 Wochen. Fehlender oder geringer Nachweis der o.g. Marker und geringe Stratifizierung in den Kontrollepithelien nach 2 Wochen (Insert b, d, f, h). Die Ergebnisse entstammen drei unabhängigen Experimenten.

desmoplakin indicated the formation of cell-to-cell contacts after just 1 week (Figures 4e and 4f). This underscored the epithelial integrity already at an early point during the culture period. By contrast, the control epithelia showed nearly no protein expression (inset Figure 4f).

The basement membrane molecules connect the epithelium to the underlying connective tissue. In this investigation, we chose laminin-5 to demonstrate basement membrane involvement. It was noteworthy that when laminin-5 was detected in the corresponding co-cultured epithelium, we also observed a time-dependent concentration in the zone below the basement cells corresponding to the in-vivo basement membrane zone (Figures 4g to 4h). It was interesting that we did not observe an in-vivo-like situation in the controls (inset, Figure 4h).

We observed fewer epithelial layers as well as reduced expression of the epithelium-specific markers in the controls (insets Figures 4b, 4d, 4f and 4h).

Our findings reveal that fibroblasts cultured on model surfaces play an essential role, made apparent by the in-vivo-like expression of the aforementioned components in the co-cultured epithelium.

All of our data from these methods originate from three independent experiments.

Discussion

Our results clearly demonstrate that gingival fibroblasts on specific microstructured pillar model substrates, co-cultured with gingival keratinocytes, have a definite influence on epithelial morphogenesis. An earlier study showed that the model surfaces biofunctionalized with fibronectin that we used in this study, are suitable for modulating the differentiation of keratinocytes in the monolayer in relation to the distance between the pillars [17]. We also used fibronectin to biofunctionalize, an extracellular matrix molecule occurring naturally in the gingival lamina propria [21] that assure that the gingival fibroblasts adhere to the heads of the elastic pillars.

In this context, differentiation is an essential cell function of epithelial cells, which can be characterized by analyzing the differentiation markers. The distribution of K1 and K10 and involucrin observed in this study demonstrates that the co-cultured epithelium generally reflects the in-vivo situation in oral gingival epithelium after 2 weeks in the presence of fibroblasts cultivated on pillar surfaces [23]. In comparison, the controls, which lacked surface-cultured fibroblasts, revealed tangibly fewer cell layers, which in turn supports the assumption that fibroblasts are an essential component of the co-culture model since they influence keratinocytic proliferation and differentiation in an in-vivo-like manner. This assumption is also supported by observation of desmoplakin, which represents the extent of epithelial integrity [9]. Studies of knockout keratinocytes stained with anti-desmoplakin demonstrated that this marker seems

der Kontrolle, in der die Keratinozyten zu identischen Zeitpunkten ohne Fibroblasten kultiviert wurden, zeigte der Vergleich, dass für K 1 sogar eine geringe Abnahme der Genexpression zu beobachten war (Abbildung 3a).

Die relativen Genexpressionsniveaus für Involucrin zeigten am Tag 14 eine Zunahme um das etwa Zweieinhalbfache. Die Kontrolle zeigte keine Modulation für Involucrin beim Vergleich der Kultivierungsphasen von 1 und 2 Wochen (Abbildung 3b).

Die Analyse der Zellfunktionen des kokultivierten Epithels auf Proteinebene wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenz dargestellt. Dabei zeigte sich eine zeitabhängige Verstärkung der K1/10-Expression beim Vergleich von 1 und 2 Wochen (Abbildungen 4a und 4b), was im Falle von K1 mit der Genexpression aus der quantitativen RT-PCR korreliert. Involucrin zeigte nach 1 Woche eine noch spärliche unregelmäßige Verteilung der Proteinexpression (Abbildung 4c), während zum späteren Kultivierungszeitpunkt von 2 Wochen eine der In-vivo-Situation vergleichbare Orientierung der Proteinexpression auf die oberen terminal differenzierten Zellschichten beobachtet werden konnte (Abbildung 4d). In der Kontrollsituation fiel auf, dass die K1/10-Protein-Expression eher spärlich war (Insert Abbildung 4b) und dass Involucrin weniger deutlich als in der Kokultur analog der In-vivo-Situation auftrat (Insert Abbildung 4d).

Für die Differenzierung ist die Aufrechterhaltung einer stabilen Epithelintegrität durch interzelluläre Kontakte unabdingbar. Im kokultivierten Epithel unserer Kokultur wies Desmoplakin bereits nach 1 Woche auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten hin (Abbildungen 4e und 4f). Dies verdeutlichte die epitheliale Integrität bereits zum frühen Kultivierungszeitpunkt. Dagegen zeigten die Kontrollepithelien nahezu keine Proteinexpression (Insert Abbildung 4f).

Die Verbindung des Epithels zum darunterliegenden Bindegewebe wird durch Moleküle der Basalmembran bewerkstelligt. Zur Darstellung der Basalmembran wurde in dieser Untersuchung Laminin-5 herangezogen. Bei Betrachtung von Laminin-5 im vorliegenden kokultivierten Epithel fiel auf, dass eine zeitabhängige Fokussierung auf die Zone unterhalb der Basalzellen zu beobachten war, was auch der Basalmembranzone in vivo entspricht (Abbildungen 4g und 4h). Interessanterweise konnte bei der Kontrolle eine solche in-vivo-ähnliche Fokussierung dieser Basalmembran Komponente nicht beobachtet werden (Insert Abbildung 4h).

Neben der verminderten Expression der genannten epithelspezifischen Marker fiel in den Kontrollen die Schichtung der Epithelien auch deutlich geringer aus (Inserts Abbildungen 4b, 4d, 4f und 4h).

Die Befunde belegen, dass die auf den Modelloberflächen kultivierten Fibroblasten bezüglich der in-vivo-ähnlichen Expression der gezeigten Komponenten im kokultivierten Epithel eine essentielle Rolle einnehmen.

Alle Ergebnisse der dargestellten Methoden entstammen von drei unabhängigen Experimenten.

to be crucial for epithelial integrity, as it reinforces the membrane connections necessary for stable intercellular adhesion during cell formation [19]. We also detected desmoplakin on the protein level in the co-cultured epithelium at both time points, while no fluorescence signal specific to desmoplakin appeared in the controls. That also leads us to conclude that epithelial integrity is seriously reduced.

The contact between the epithelium and the basement membrane, and intercellular epithelial contacts are key to effective epithelial cell function. The basement membrane separates the epithelium from the lower connective tissue. This separation is realized by a series of highly-organized extracellular matrix molecules. Laminin-5, the extracellular-matrix molecule of which the basement membrane is made and, which forms the anchoring filaments in the lamina lucida, is crucial for keratinocyte-basement-membrane adhesion [7, 15]. We noted that protein's distribution became sporadic after 1 week, whereas it was distributed uniformly after 2 weeks below the basal layer of keratinocytes. Interestingly, our in-vitro findings reflect the keratinocytes' adhesion to the basement membrane under in-vivo conditions [3]. The fact that the aforementioned basement-membrane marker was absent in the subbasal layer in the controls provides evidence that the epithelium co-cultured on the surfaces with fibroblasts (considering the protein orientation of K1/10 and involucrin) and the epithelial integrity marker desmoplakin represents a much more similar in-vivo phenotype than the controls. The distribution pattern of laminin-5, the marker indicating the basement membrane, thus demonstrates that fibroblasts play a key role in the in-vivo-like regulation of epithelial biomarkers.

In summary, these investigations illustrate that a co-culture model consisting of gingival fibroblasts and gingival keratinocytes was successfully established on microstructured model surfaces. It is thus possible to generate such a co-culture model under specific extracellular conditions. The degree of co-cultured epithelial stratification and above all the in-vivo-like expression and distribution of the differentiation markers and basement membrane components depends on the presence of fibroblasts on the surfaces.

The time-dependent protein expression of tissue-specific markers (resembling the in-vivo situation) only becomes apparent when fibroblasts exert their effect in a co-cultured epithelium. These tissue-specific markers are characteristic of biological functions such as epithelial morphogenesis, differentiation, and in maintaining epithelial integrity.

Conclusion

The use of such microstructured model surfaces allows us to analyze cell functions in relation to the extracellular environment at the interface between material science and biology. The better we understand extracellular functions in the human periodontium, the better we will be able to modulate those environmental conditions in the future,

Diskussion

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse machen deutlich, dass Gingivafibroblasten auf definierten mikrostrukturierten Pillarmodelloberflächen, kokultiviert mit Gingivakeratinozyten, einen entscheidenden Einfluss auf die epitheliale Morphogenese haben. In einer früheren Untersuchung konnte bereits gezeigt werden, dass die hier verwendeten fibronectinbiofunktionalisierten Modelloberflächen geeignet sind, die Differenzierung von Keratinozyten im Monolayer in Abhängigkeit vom Pillarabstand zu modulieren [17]. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung wurde das Extrazellulärmatrixmolekül Fibronectin für die Biofunktionalisierung verwendet, das natürlicherweise in der Lamina propria der Gingiva vorkommt [21] und die Adhäsion der Gingivafibroblasten auf den Köpfen der elastischen Pillare gewährleistet.

In diesem Kontext stellt die Differenzierung eine essentielle Zellfunktion epithelialer Zellen dar, und diese können durch Analyse von Differenzierungsmarkern charakterisiert werden. Dabei zeigte die in dieser Untersuchung beobachtete Distribution der frühen Keratinozytendifferenzierungsmarker K1 und K10 und des späten Differenzierungsmarkers Involucrin, dass das kokultivierte Epithel nach 2 Wochen in Anwesenheit der auf den Pillaroberflächen kultivierten Fibroblasten weitgehend die In-vivo-Situation eines oralen Gingivaepithels widerspiegelt [23]. Demgegenüber zeigte der Kontrollansatz mit Keratinozyten in Abwesenheit der auf den Oberflächen kultivierten Fibroblasten deutlich weniger Zellschichten, was wiederum die Annahme unterstützt, dass Fibroblasten essentieller Bestandteil des Kokulturmodells sind, da sie Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten in in-vivo-ähnlicher Weise beeinflussen. Diese Annahme wird bei der Betrachtung des Markers Desmoplakin, der das Ausmaß der epithelialen Integrität repräsentiert, zusätzlich untermauert [9]. In Untersuchungen von mit Anti-Desmoplakin gefärbten Knockout-Keratinozyten konnte demonstriert werden, dass dieser Marker unabdingbar für die epitheliale Integrität zu sein scheint, da es die Membranverbindungen, die für eine stabile interzelluläre Adhäsion während der Zellformation notwendig ist, verstärkt [19]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte Desmoplakin auf Proteinebene im kokultivierten Epithel zu beiden Zeitpunkten deutlich detektiert werden, wobei in den Kontrollen keine desmoplakinspezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, was wiederum auf eine stark verminderte Epithelintegrität schließen lässt.

Neben den interzellulären epithelialen Kontakten ist die Verbindung des Epithels zur Basalmembran für die epithelialen Zellfunktionen von entscheidender Bedeutung. Im Gewebe wird das Epithel durch die Basalmembran vom darunter liegenden Bindegewebe getrennt. Diese Trennung wird durch eine Reihe von hoch organisierten Extrazellulärmatrixmolekülen realisiert. Für das basalmembrankonstituierende Extrazellulärmatrixmolekül Laminin-5, das die in der Lamina lucida lokalisierten Verankerungsfilamente bildet und für die

thus contributing to the optimization and development of biomaterials, especially in regenerative dentistry.

Acknowledgements

We thank Ms. Annette Kohl of the Department of Orthodontics at the University of Heidelberg who made a major contribution to this study. The project was also financially supported by the Scientific Research Fund of the German Orthodontic Society (DGKFO).

References

1. Bloor BK, Tidman N, Leigh IM, et al. Expression of keratin K2e in cutaneous and oral lesions: association with keratinocyte activation, proliferation, and keratinization. *Am J Pathol* 2003;162:963–75.
2. Boehnke K, Mirancea N, Pavesio A, et al. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur J Cell Biol* 2007;86:731–46.
3. Haas KM, Berndt A, Stiller KJ, et al. A comparative quantitative analysis of laminin-5 in the basement membrane of normal, hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1261–8.
4. Lemmon CA, Sniadecki NJ, Ruiz SA, et al. Shear force at the cell-matrix interface: enhanced analysis for microfabricated post array detectors. *Mech Chem Biosyst* 2005;2:1–16.
5. Mohrdieck C, Wanner A, Roos W, et al. A theoretical description of elastic pillar substrates in biophysical experiments. *Chemphyschem* 2005;6:1492–8.
6. Müssig E, Tomakidi P, Steinberg T. Molecules contributing to the maintenance of periodontal tissues. Their possible association with orthodontic tooth movement. *J Orofac Orthop* 2005;66:422–33.
7. Nischt R, Schmidt C, Mirancea N, et al. Lack of nidogen-1 and -2 prevents basement membrane assembly in skin-organotypic coculture. *J Invest Dermatol* 2007;127:545–54.
8. Park JM, Koak JY, Jang JH, et al. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:859–66.
9. Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:383–408.
10. Reuther T, Kohl A, Komposch G, et al. Morphogenesis and proliferation in mono- and organotypic co-cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and alveolar bone cells. *Cell Tissue Res* 2003;312:189–96.
11. Roesch-Ely M, Steinberg T, Bosch FX, et al. Organotypic co-cultures allow for immortalized human gingival keratinocytes to reconstitute a gingival epithelial phenotype in vitro. *Differentiation* 2006;74:622–37.
12. du Roure O, Saez A, Buguin A, et al. Force mapping in epithelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2390–5.
13. Ruhrberg C, Watt, FM. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7:392–7.
14. Scheideler L, Rupp F, Wendel HP, et al. Photocoupling of fibronectin to titanium surfaces influences keratinocyte adhesion, pellicle formation and thrombogenicity. *Dent Mater* 2007;23:469–78.

Keratinocyten-Basalmembran-Adhäsion unerlässlich ist [7, 15], zeigte sich nach 1 Woche eine sporadische Verteilung des Proteins, während nach 2 Wochen eine homogene Verteilung unterhalb der basalen Keratinocyten zu erkennen war. Interessanterweise reflektieren die In-vitro-Befunde die Situation der Keratinocytenadhäsion zur Basalmembran unter In-vivo-Bedingungen [3]. Die fehlende subbasale Lokalisation des erwähnten Basalmembranmarkers in den Kontrollen gibt darüber Aufschluss, dass das auf den mit Fibroblasten kultivierten Oberflächen kokultivierte Epithel im Hinblick auf die Proteinorientierung der Differenzierungsmarker (Keratin 1/10 und Involucrin) und des Markers für epitheliale Integrität (Desmoplakin) im Vergleich einen viel ähnlicheren In-vivo-Phänotyp repräsentiert als die Kontrollen. Das Verteilungsmuster des basalmembrankonstituierenden Markers Laminin-5 demonstriert damit, dass die Fibroblasten eine Schlüsselrolle für eine in-vivo-ähnliche Regulierung der epithelialen Biomarker darstellen.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass es gelungen ist, ein Kokulturmodell bestehend aus Gingiva-fibroblasten und Gingivakeratinocyten auf mikrostrukturierten Modelloberflächen zu etablieren. Das bedeutet, dass eine Kultivierung eines solchen Kokulturmodells unter definierten extrazellulären Bedingungen möglich ist. Entscheidend hierfür bei der Beurteilung ist, dass die Ausprägung der Stratifizierung des kokultivierten Epithels und vor allem die in-vivo-ähnliche Expression und Distribution der Differenzierungsmarker und Basalmembrankomponente von der Präsenz der Fibroblasten auf den Oberflächen abhängig ist.

Nur unter dem Einfluss der Fibroblasten ist im kokultivierten Epithel eine zeitabhängige, der In-vivo-Situation ähnliche Proteinexpression gewebespezifischer Marker aus den biologischen Funktionsbereichen Epithelmorphogenese, der Differenzierung sowie der epithelialen Integrität zu erkennen.

Schlussfolgerung

Mit Hilfe der hier verwendeten mikrostrukturierten Modelloberflächen ist es möglich, an der Schnittstelle zwischen der Materialforschung und Biologie, Zellfunktionen in Abhängigkeit von der extrazellulären Umgebung zu analysieren. Prospektiv kann durch diesen Ansatz, d. h. durch Determinierung der extrazellulären Umgebung, ermöglicht werden, durch direkte Modulation der Umgebungsbedingungen Einfluss auf die Zellfunktionen von Zellen des humanen Parodonts zu nehmen, und damit zur Optimierung und Neuentwicklung von Biomaterialien, vor allem in der regenerativen Zahnheilkunde beizutragen.

Danksagung

Wir danken Frau Annette Kohl, Poliklinik für Kieferorthopädie des Universitätsklinikums Heidelberg, die experimentell wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen hat. Darüber hinaus wurde das Projekt durch den Wissenschaftsfond der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie (DGKFO) finanziell unterstützt.

15. Spirito F, Chavanas S, Prost-Squarcioni C, et al. Reduced expression of the epithelial adhesion ligand laminin 5 in the skin causes intra-dermal tissue separation. *J Biol Chem* 2001;276:18828–35.
16. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Wilson JL, et al. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. *Periodontol* 2006;41:88–108.
17. Steinberg T, Schulz S, Spatz JP, et al. Early keratinocyte differentiation on micropillar interfaces. *Nano Lett* 2007;7:287–94.
18. Tan JL, Tien J, Pirone DM, Gray DS, et al. Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:1484–9.
19. Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, et al. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 2001;3:1076–85.
20. Vigneswaran N, Peters KP, Hornstein OP, et al. Comparison of cyto-keratin, filaggrin and involucrin profiles in oral leukoplakias and squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989;18:377–90.
21. Walsh P, Häkkinen L, Pernu H, et al. Expression of fibronectin-binding integrins in gingival epithelium in drug-induced gingival overgrowth. *J Periodontal Res* 2007;42:144–51.
22. Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol* 2001;11:143–6.
23. Ye P, Chapple CC, Kumar RK, et al. Expression patterns of E-cadherin, involucrin, and connexin gap junction proteins in the lining epithelia of inflamed gingiva. *J Pathol* 2000;192:58–66.

Correspondence Address

Dr. Eva Müssig
 Abteilung für Kieferorthopädie und Abteilung für Orale
 Biotechnologie
 Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
 Universitätsklinikum Freiburg
 Hugstetter Str. 55
 79106 Freiburg
 Germany
 Phone: (+49/761) 270-4944, Fax: -4852
 e-mail: eva.muessig@uniklinik-freiburg.de