



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cellular signaling in human cholesteatoma

Huisman, Margaretha Aleida

Citation

Huisman, M. A. (2007, January 24). *Cellular signaling in human cholesteatoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/9449>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/9449>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting en Algemene Nabeschuwing

Samenvatting en Algemene Nabeschuwing

Samenvatting

In vergelijking met modern onderzoek zoals gen expressie profiling lijkt deze studie, die zich alleen richt op de expressie van eiwitten, tamelijk beperkt. Met betrekking tot het cholesteatoom zijn er echter sterke argumenten om de expressie van bepaalde eiwitten te onderzoeken. Cellulaire signalerings routes zijn activerings processen, die de cel motiveren tot een serie van reacties op een bepaalde toestand in of buiten de cel, bijvoorbeeld als er sprake is van cellulaire stress. Een dergelijke signalering is posttranscriptioneel, wat betekent dat activatie van een signaal niet het gevolg is van een toename van een bepaald eiwit, dus na transcriptie van het DNA, maar door het feit of een bepaald eiwit wel of niet geactiveerd is. Bovendien zijn in het cholesteatoom het epitheel en het stroma zodanig met elkaar verstrengeld (Hoofdstuk 7, fig. 1) dat het onmogelijk is om, bijvoorbeeld met eiwitsplitsende enzymen, het epitheel van het stroma te scheiden om met behulp van moleculaire technieken de verschillende cellen ervan te onderzoeken. Daarnaast, in de huid, hebben de cellen van de basale laag een ander eiwit expressie profiel dan de cellen in de suprabasale lagen en in de stratum corneum. Het onderzoek naar de aanwezigheid van verschillende eiwitten en de activatie daarvan in cellen in bepaalde huidlagen is daarom van belang in deze studie.

In **hoofdstuk 1** wordt het cholesteatoom beschreven vanuit een klinisch, morfologisch, biologisch en moleculair gezichtspunt. Verschillende theorieën met betrekking tot het ontstaan van het cholesteatoom worden besproken. Op grond van verschillende argumenten wordt onderscheid gemaakt tussen de benigne (goedaardige) kenmerken van het cholesteatoom en die van een maligniteit (kwaadaardige tumor). In dit hoofdstuk worden de kenmerken van wondgenezing en ontsteking in het cholesteatoom, en de hieruit volgende complexiteit van de eiwit signalering aangegeven.

In **hoofdstuk 2** wordt een gedetailleerde beschrijving gepresenteerd van de verschillende cellulaire signalerings routes en eiwitten, die onderzocht zijn in dit proefschrift. Deze routes, van celmembraan naar -kern, zijn de drie MAPKinases-, de pAkt- en de TGF β signalerings routes. Bovendien wordt uiteengezet hoe p53 geactiveerd kan worden, wat de invloed van p53 is op apoptotische processen en wat de gecompliceerde rol is van p21^{cip1/waf1} met betrekking tot de cel cyclus.

In **hoofdstuk 3**, zijn de verschillen in de mate van proliferatie, cel cyclus arrest en apoptose tussen cholesteatoom en controle huid vastgesteld. Onze resultaten laten zien, dat in het epitheel van het cholesteatoom Ki-67 verhoogd aanwezig is en dat dit vergezeld wordt van een toename van zowel p53 als van het cel cyclus arrest eiwit p21^{cip1/waf1}. Wij toonden ook een significant positieve correlatie aan tussen p53 en p21^{cip1/waf1}. Er was minimaal apoptose in het epitheel van het cholesteatoom. Dit werd aangetoond door de actief Caspase 3 kleuring en de TUNEL test. Het is van buitengewoon belang in de immunohistochemie om de

juiste controles te gebruiken. Dit is maar al te waar gebleken met betrekking tot de TUNEL test, want de vals-positieve TUNEL kleuring was een belangrijk probleem dat in het begin van dit onderzoek opgelost moest worden. Het is veelbetekenend, dat in verschillende publicaties geen controles zijn gebruikt en/ of dat foto's van apoptotische cellen niet getoond worden, zodat deze studies niet betrouwbaar genoemd kunnen worden^{1,2}. Het is van belang te onderkennen, dat zowel een apoptotische morfologie als een positieve apoptotische kleuring aanwezig moeten zijn om een cel apoptotisch te kunnen noemen, dit is helaas niet altijd het geval^{3,4}. De resultaten van het onderzoek van het epitheel van het cholesteatoom geven aan, dat de verhoogde proliferatie niet gecompenseerd wordt door apoptose maar zou kunnen samengaan met cel cyclus arrest.

De resultaten van **hoofdstuk 4** laten zien, dat in cholesteatoom epitheel de Ras/Raf/ ERK1/2 MAPKinase signalerings route betrokken is bij de p53-afhankelijke toename van p21^{cip1/waf1} expressie. Dit werd bevestigd door de gecorreleerde expressie van p53 en p21^{cip1/waf1} en die van p21^{cip1/waf1} en geactiveerde ERK1/2. Interessant is dat activatie van ERK1/2 geassocieerd wordt met zowel stimulatie als met remming van cel proliferatie. De sterkte en de duur van de ERK1/2 activatie bepaalt het antwoord van de cel: proliferatie of cel cyclus arrest. De door ERK1/2 bewerkstelligde opregulatie van proliferatie vereist een tijdelijk, laag ERK1/2 activeringssignaal, terwijl opregulatie van p21^{cip1/waf1} een sterk en langdurig ERK1/2 activeringssignaal vereist. In het epitheel van het cholesteatoom zijn deze verschillende processen zichtbaar door de enkelvoudige ERK1/2 expressie in het proliferatieve compartiment. In de suprabasale lagen, waar langdurige ERK1/2 expressie aanwezig is, zijn de cellen ook positief bevonden voor het cel cyclus arrest eiwit p21^{cip1/waf1}. Aanhoudende remming van de cel cyclus veroorzaakt stapeling van epitheliale cellen die in G⁰-arrest zijn⁵. Wij concluderen daarom, dat in het cholesteatoom overheersende cel cyclus arrest zou kunnen bijdragen aan epitheliale hyperplasie.

Veranderingen in specifieke signaleringsroutes zouden de abnormale terminale differentiatie kunnen verklaren van de keratinocyten in het cholesteatoom.

In **hoofdstuk 5** is de correlatie onderzocht tussen terminale differentiatie en signalering via de MAPKs. In dit hoofdstuk is aangetoond dat de aanwezigheid van geactiveerd ERK1/2 en -p38 positief geassocieerd is met de expressie van involucrine. Geactiveerd JNK lijkt niet betrokken te zijn bij dit proces. Dit geeft aan, dat terminale differentiatie in het epitheel van het cholesteatoom geschiedt via activatie van ERK1/2 en p38 signaleringsroutes. Onze resultaten zijn in tegenspraak met eerdere publicaties waarin p38 signalering het belangrijkste regulerend mechanisme wordt genoemd⁶. Wij konden ook niet de bevinding van Efimova bevestigen met betrekking tot de p38-gerelateerde reductie van ERK1/2 activiteit⁷. In dit hoofdstuk wordt beargumenteerd dat groeifactor receptor activatie en andere pro-inflammatoire responsen een parallelle ERK1/2 and p38 signalering teweeg zou kunnen brengen. Een andere reden voor autonome ERK1/2 activatie zou kunnen zijn dat keratinocyten in het cholesteatoom onderworpen zijn aan een

overlevingsprogramma veroorzaakt door verminderde cel-matrix hechting. Het is aangetoond, dat de basaal membraan van het cholesteatoom afwijkend en onderbroken is⁸. Bescherming van cellen tegen apoptose door verminderde cel-matrix binding is geassocieerd met, en vereist een langdurige ERK1/2 MAPK activatie⁹. De aanname dat cholesteatoom keratinocyten onderworpen zijn aan een dergelijke hechtings-onafhankelijke overleving is in overeenstemming met onze eerder aangetoonde langdurige ERK1/2 activatie en minimale apoptose^{10,11}. Het opmerkelijke is dat dit overlevingsmechanisme van belang is bij de voortgang van weefselherstel en, in de huid, voor de migrerende keratinocyten aan de frontlinie van de wond. De argumenten van een parallele signalering ten gevolge van een door inflammatie geïnduceerde stress respons of van een keratinocyten-overlevingsprogramma gedurende wondgenezing kunnen met betrekking tot het cholesteatoomweefsel zeker waar zijn (persoonlijke communicatie met Efimova).

De bevinding in **hoofdstuk 6** was dat het overlevingseiwit pAkt/PKB significant verhoogd is ten opzichte van controle huid. Deze waarneming valt samen met de resultaten uit eigen eerdere publikaties waarin minimale apoptose is aangetoond in het epitheel van het cholesteatoom. Het eiwit dat betrokken is bij late terminale differentiatie, filaggrine, werd significant verlaagd aangetroffen en hoewel aangetoond is dat PI3K/Akt signalering betrokken is bij terminale differentiatie, konden wij geen associatie aantonen tussen pAkt en filaggrine¹². Involucrine, dat eveneens betrokken is bij terminale differentiatie, was significant verhoogd, maar ook tussen pAkt en involucrine konden we niet een relatie aantonen. In psoriasis echter, is melding gemaakt van eenzelfde differentiatie profiel: een verhoogde involucrine expressie en een afwezigheid of verlaging van de hoeveelheid filaggrine^{13,14}. Er is gesuggereerd dat abnormale structuren van adhesiemoleculen verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de ontregeling in productie van de componenten van de cornified envelope¹⁵. Deze suggestie is onlangs ondersteund door een artikel van Calautti, waarin bewezen werd dat de cadherine-catenine adhesie complexen nodig zijn om tot een differentiatie-specifieke activatie van PI3K te komen¹². Kortom, bescherming tegen apoptose geschiedt door middel van geactiveerde Akt, maar voor de aanzet tot late differentiatie is nog een andere component nodig: cel adhesie. Bij de analyse van de integriteit van cholesteatoom weefsel vonden Naim et al. dat, in tegenstelling tot normale huid, beta-catenine verminderd dan wel afwezig was in de suprabasale lagen van het cholesteatoom¹⁶. Dit impliceert dat, in overeenstemming met onze eerdere publicaties, verminderd of afwezig cellulair contact in cholesteatoom epitheel de oorzaak kan zijn van zowel verhoogde involucrine als van een verlaagde filaggrine expressie.

Van TGF β wordt aangenomen dat het een spilfunctie inneemt bij wond genezing en de onderzoeksvraag van **hoofdstuk 7** was of in het cholesteatoom, de TGF β signalerings route is geactiveerd.

In de epithelia van cholesteatoom en huid vonden we overeenkomstige expressies van TGF β en geactiveerd Smad2 (pSmad2), maar in het cholesteatoom

was de expressie van de antagonist Smad 7 verlaagd ten opzichte van normale huid. De correlaties tussen TGF β , pSmad2 en Smad7 zijn een indicatie dat Smad activatie en remming beide operationeel zijn. Desalnietemin, ondanks de verlaagde Smad7 expressie leiden deze processen niet tot een significante toename van pSmad2. Het is vermeld dat behalve de remming van Smad2 activatie, Smad7 een belangrijke rol lijkt te spelen bij het bewerkstelligen van apoptose door activatie van de JNK signalerings route. De verlaagde Smad7- en onze eerder aangetoonde niet verhoogde JNK expressie in cholesteatoom epitheel zou daarom kunnen duiden op bescherming tegen apoptose. In dit hoofdstuk vergelijken we in een pilot studie de resultaten van deze studie met die van de resultaten van ons onderzoek naar de MAPKinase signalerings route en we hebben correlaties gevonden tussen TGF β , pSmad2 en pERK1/2 ($p=0.02$ and 0.03). Wij veronderstellen dat in het epitheel van het cholesteatoom, een standaard niveau van TGF β effectief kan worden door samenwerking met andere signalerings routes, en dat dit weer kan leiden tot verhoogde transcriptie van verschillende genen. Een van deze genen zou p21^{cip1/waf1} kunnen zijn, dat we eerder al verhoogd aanwezig hebben gevonden en dat bovendien gerelateerd is aan ERK1/2 expressie¹⁰. Dit kan een fijn regulerings mechanisme zijn van de TGF β signalering, wat aangeeft dat eiwit signalering verhoogd kan zijn, maar sterk gecontroleerd.

In het stroma van het cholesteatoom zijn TGF β and pSmad2 verhoogd, terwijl de Smad7 expressie gelijk was aan die in controle huid. EDA-fibronectine (EDA-FN) accumulatie in het stroma van het cholesteatoom was excessief, terwijl er geen EDA-FN aantoonbaar was in controle huid. In dit hoofdstuk wordt beargumenteerd dat de verhoogde stromale expressies van TGF β , pSmad2 en EDA-FN, het cellulaire antwoord is op een langdurige ontsteking. Er zijn verschillende redenen voor een dergelijke hypothese: 1) het cholesteatoom kan worden beschouwd als een "vreemd lichaam", dat in het middenoor een steeds terugkerende (=chronische) ontstekingsreactie kan veroorzaken¹⁷. 2) De inflammatie is chronisch omdat in de meeste cholesteatomen biofilms aanwezig zijn die endotoxinen en bacteriën kunnen vrijmaken¹⁸. Evenals bacteriën kunnen endotoxinen opnieuw de ontsteking initiëren door de cellen aan te zetten tot de productie van cytokinen. 3) inflammatie kan zichzelf consolideren door het gebrek aan clearance in de omsloten ruimte van het midden oor. Er kan ook een combinatie mogelijk zijn van deze drie factoren, of ze zouden allemaal een rol kunnen spelen in de chroniciteit van het cholesteatoom. In dit hoofdstuk geven we aan, dat het cholesteatoom een proces is van chronische wondgenezing, waaraan de TGF β signalerings route en de voortdurende ontsteking lijken bij te dragen

Algemene Nabeschuwing

In het epitheel van het cholesteatoom zijn verhoogde expressies gevonden van eiwitten die betrokken zijn bij proliferatie (Ki-67), cel cyclus arrest (p53 en p21^{cip1/waf1}), voortijdige terminale differentiatie (involucrine) en overleving (pAkt). Bovendien is aangetoond dat de activatie van MAPK- verhoogd is en geassocieerd is met de TGF β signalerings route. De eiwitten waarvan de expressie verlaagd was, hebben betrekking op late terminale differentiatie (filaggrine) en apoptose (actief Caspase3). We hebben verschillende correlaties gevonden tussen de verschillende eiwitten die onderzocht zijn. We veronderstellen, dat deze correlaties binnen de context passen van samenhangende signalerings processen. Het lijkt dat deze connecties in zowel de MAPK- als de TGF β signalering, cel cyclus arrest, vroege terminale differentiatie en overleving ondersteunen, wat kenmerkend is voor wondgenezing. Samenvattend suggereert dit, dat het epitheel van het cholesteatoom zich gedraagt als een wond genezingsproces met migrerende keratinocyten. Veel biologische karakteristieken van het epitheel van het cholesteatoom kunnen verklaard worden met behulp van dit concept. Verhoogde proliferatie, aangetoond door de proportioneel verhoogde Ki-67, wordt niet gecompenseerd door verhoogde apoptose. Dit kan hyperplasie verklaren, wat een normaal fenomeen is in het cholesteatoom. Hypertrofie is ook frequent aanwezig en kan veroorzaakt worden door cel cyclus arrest, maar ook door differentiatie, omdat deze twee processen het cellulair volume doen toenemen^{19,20}. Bovendien is het aangetoond dat keratinocyten in een wondgenezingsproces hypertroof zijn (wat derhalve een gevolg is van cel cyclus arrest en afwijkende differentiatie)²¹. Afwijkende differentiatie, door de voortijdige expressie van involucrine maar ook door de vermindering van filaggrine, kan veroorzaakt worden door verlies van adhesie^{12,15}. Dit verlies van adhesie kan veroorzaakt zijn door een onderbroken en veranderde basaal membraan en/of een verminderde α catenine expressie. Beide verschijnselen zijn eerder aangetoond in het epitheel van het cholesteatoom^{8,16}. Bovendien is het gebrek aan adhesie zichtbaar omdat in verschillende publikaties op foto's van een cholesteatoom een verwijding van de intercellulaire ruimtes te zien is, dit laatste is ook vermeld als een fenomeen in wond genezing²¹. De afname van filaggrine kan ook een ander biologisch kenmerk van het epitheel van het cholesteatoom verklaren: dat van parakeratose. Als de late terminale differentiatie niet opgestart wordt, behouden de cellen hun kernen en wordt het weefsel parakeratotisch. Interessant is dat vroege terminale differentiatie, zoals aangetoond door involucrine expressie, de proliferatie niet doet stoppen, want involucrine-positieve cellen zijn nog in staat om DNA te synthetiseren¹⁹. De toename van TGF β en pSmad2 in het stroma van cholesteatoom en de verhoogde EDA-fibronectine duiden ook op een chronisch wondgenezingsproces. In het cholesteatoom is dit proces duidelijk zichtbaar door de accumulatie van EDA-fibronectine. Hoewel chronisch, nemen we aan, dat dit toch een onderdeel is van normale wondgenezing want EDA-fibronectine is noodzakelijk voor normale, zelfbeperkende wondgenezing²². Bovendien, bij normale wondgenezing is het laatste signaal dat van de verdwijning van de ontstekingscellen. Het is vermeld dat dit gebeurt door middel van apoptose²³. In hoofdstuk 3, hoewel er minimaal apoptose

was in het epitheel, vonden we vele apoptotische cellen in het stroma. De recurrency van het cholesteatoom kan ook worden verklaard, want cellen kunnen, zelfs vele jaren na verwonding, opnieuw geactiveerd worden²⁴.

Samenvattend, in het cholesteatoom lijkt cellulaire signalering te verlopen langs de lijnen van normale, maar chronische wondgenezing.

Toekomstig onderzoek.

Wij adviseren onderzoek te verrichten naar farmacologische interventies gericht op ontstekings controle. Omdat de toediening van antibiotica niet erg succesvol is gebleken- waarschijnlijk wegens de aanwezigheid van biofilms- denken wij dat het gebruik van antimicrobiële peptiden een geschikte nieuwe therapie zou kunnen zijn.

Om meer inzicht te verwerven in het ontstaan van het cholesteatoom stellen wij voor om de invloed van externe stimuli, zoals keratine deeltjes en endotoxinen, op de eiwitexpressie en het eiwit signaal profiel te bestuderen in het advancing front van huid uit de buitenste gehoorgang en midden oorslijmvlies²⁵. Retractiepockets worden beschouwd als een voorstadium van cholesteatoom vorming, hoewel de daadwerkelijke ontwikkeling tot een cholesteatoom niet te voorspellen is. Het is daarom van belang om de eiwitexpressie en het eiwit signaleringsprofiel van retractiepocket weefsel te vergelijken met dat van cholesteatoom. Wij doen daarnaast nog de aanbeveling om te bestuderen in hoeverre biofilms een rol spelen in de ontwikkeling en voortgang van het cholesteatoom. Dit zou gedaan kunnen worden door middel van de detectie van zowel bacteriekolonies als van hun glyocalix laag in retractiepockets en in verschillende soorten cholesteatoom.

Literatuurverwijzing

1. Choufani G, Mahillon V, Decaestecker C, Lequeux T, Danguy A, Salmon I, Gabius HJ, Hassid S, Kiss R. Determination of the levels of expression of sarcolectin and calyculin and of the percentages of apoptotic but not proliferating cells to enable distinction between recurrent and nonrecurrent cholesteatomas. *Laryngoscope*. 1999 Nov;109(11):1825-31.
2. Sheikholeslam-Zadeh R, Decaestecker C, Delbrouck C, Danguy A, Salmon I, Zick Y, Kaltner H, Hassid S, Gabius HJ, Kiss R, Choufani G The levels of expression of galectin-3, but not of galectin-1 and galectin-8, correlate with apoptosis in human cholesteatomas. *Laryngoscope*. 2001 Jun;111(6):1042-7.
3. Park K, Choung YH, Chun YM, Lee JS, Hong SP. Reversibility of experimental cholesteatoma epithelium using Mongolian gerbils. *Acta Otolaryngol*. 2005 May;125(5):540-6.
4. Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L. Apoptosis in the pathogenesis of cholesteatoma in adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2005 Dec 24.
5. Clark JA, Black AR, Leontieva OV, Frey MR, Pysz MA, Kunneva L, Woloszynska-Read A, Roy D, Black JD. Involvement of the ERK signaling cascade in Protein Kinase C-mediated cell cycle arrest in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2004 Mar 5; 279(10): 9233-9247.
6. Efimova T, Eckert RL. Regulation of human involucrin promoter activity by novel protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*. 2000 Jan 21;275(3):1601-7.

-
7. Efimova T, Broome AM, Eckert RL. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):34277-85.
 8. Bernal Sprekelsen M, Ebmeyer J, Anonopoulos A, Borkowski G, Sudhoff H. Alterations of the basal membrane in middle ear cholesteatoma *Acta Otorrinolaringol Esp*; 2001;52(4):330-5.
 9. Jost M, Huggett TM, Kari C, Rodeck U. Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol Biol Cell*. 2001;12(5):1519-27.
 10. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Sustained extracellular signal-regulated kinase1/2 mitogen-activated protein kinase signaling is related to increased p21 expression in cholesteatoma epithelium. *Acta Oto-Laryngologica* 2005;125:134-40.
 11. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol*. 2003;123(3):377-82.
 12. Calcutta E, Li J, Saoncella S, Brisette JL, Goetinck PF. Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death. *J Biol Chem*. 2005;280(38):32856-65.
 13. Watanabe S, Wagatsuma K, Ichikawa E, Takahashi H. Abnormal distribution of epidermal protein antigens in psoriatic epidermis. *J Dermatol*. 1991;18(3):143-51.
 14. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J dermatol*. 2004;31(4):271-6.
 15. Metze D, Rütten A. Granular parakeratosis- a unique acquired disorder of keratinization. *J Cutan Pathol* 1999;26:339-52.
 16. Naim R, Sadick H, Schafer C, Hormann K. External auditory canal cholesteatoma: analysis of the integrity of the tissue structure. *Int J Mol Med*. 2004;14(4):601-4.
 17. Chole RA, Hughes RM, Faddis BT. Keratin particle-induced osteolysis: a mouse model of inflammatory bone remodeling related to cholesteatoma. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2001 Mar;2(1):65-71.
 18. Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002 Oct;128(10):1129-33.
 19. Gandarillas A. Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontol*. 2000 Feb;35(1):53-62.
 20. Roper E, Weinberg W, Watt FM, Land H. p19ARF-independent induction of p53 and cell cycle arrest by Raf in murine keratinocytes. *EMBO Rep*. 2001 Feb;2(2):145-50.
 21. Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol*. 2003 Aug;121(2):219-30.
 22. Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, Baralle FE. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol*. 2003 Jul 7;162(1):149-60.
 23. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Sep;30(9):1019-30.
 24. Peled ZM, Chin GS, Liu W, Galliano R, Longaker MT. Response to tissue injury. *Clin Plast Surg*. 2000 Oct;27(4):489-500.
 25. Albers-op t' Hof BM, Peek FA, Huisman MA, Grote JJ. Air-exposed tissue culture of human middle ear epithelium and meatal epidermis: a method to study the advancing front of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol*. 2002 Oct;122(7):720-5