



**Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse unter Verwendung
von Epithel- und mikrovaskulären Endothelzellen auf einer Matrix aus
dezellularisiertem Schweinedarm**

**Tissue engineering of human salivary gland using
epithelial and microvascular endothelial cells
on a decellularized porcine matrix**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Simon Lennartz

aus

Aachen

Würzburg, im Jahre 2018

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

1. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med Norbert Kleinsasser, MHBA

2. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk

3. Betreuer: Dr. sc. hum. Marco Metzger

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VI
Abstract.....	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau der Speicheldrüsen und Funktionen des Speichels	1
1.2 Xerostomie und ihre Ursachen	2
1.2.1 Bestrahlung von Kopf-Hals-Tumoren	3
1.2.2 Xerogene Medikamente und Chemotherapie	4
1.2.3 Sjögren-Syndrom	4
1.3 Prävention der Xerostomie nach Bestrahlung	5
1.3.1 Intensitätsmodulierte Radiotherapie	5
1.3.2 Amifostin-Therapie	5
1.4 Angewandte Therapieverfahren der Xerostomie	6
1.4.1 Medikamentöse Therapie.....	6
1.4.2 Operative Verfahren	6
1.4.3 Alternativtherapeutische Ansätze	6
1.5 Experimentelle Ansätze zur Behandlung der Xerostomie	7
1.5.1 Stammzellbasierte Regenerationsstrategien	7
1.5.2 Gentherapeutische Ansätze	8
1.5.3 Tissue Engineering	9
1.6 Grundzüge der Zellkultur	12
1.7 Zielsetzung.....	13
2. Methoden	14

2.1 Isolation von primären Zellen	15
2.1.1 Isolation von humanen Speicheldrüsenepithelzellen aus OP-Präparaten	15
2.1.2 Isolation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen	16
2.2 Zellkultur.....	18
2.2.1 Passagieren von Zellen	19
2.2.2 Kultivierung von humanen Speicheldrüsenepithelzellen in der Zellkulturflasche.....	20
2.2.3 Kultivierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen in der Zellkulturflasche.....	20
2.2.4 Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität.....	21
2.2.5 Fluorescein-Diacetat-Ethidiumbromid-Färbung.....	22
2.3 Herstellung der Matrix SIS-muc	23
2.3.1 Gewinnung des porzinen Jejunums	23
2.3.2 Ablauf der Dezellularisierung	23
2.5 3D-Kultur auf der SIS-muc	25
2.5.1 Aufbau der Zellkronen	25
2.5.2 Einspannen und Vorbehandeln der SIS-muc	26
2.5.3 Aussäen der mikrovaskulären Endothelzellen.....	28
2.5.4 Aussäen der humanen Speicheldrüsenepithelzellen	28
2.5.5 Kultivierung humaner Speicheldrüsenepithelzellen in Mono- und Kokultur mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen auf der SIS-muc.....	28
2.6 Histologie.....	29
2.6.1 Fixierung von Gewebe und Zellen auf der SIS-muc	29
2.6.2 Herstellung der Kryoschnitte	29
2.6.3 Herstellung der Paraffinschnitte.....	29

2.6.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	31
2.7 Immunfluoreszenz.....	33
2.7.1 Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung	33
2.7.2 Antigen-Aufbereitung	33
2.7.3 Immunfluoreszenz-Färbung.....	33
2.8 α -Amylase-Assay	34
2.8.1 Prinzip des α -Amylase-Assay.....	34
2.8.2 Gewinnung der Proben.....	34
2.8.3 Durchführung des α -Amylase-Assay.....	35
2.9 Rasterelektronenmikroskopische Analyse.....	37
2.9.1 Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie	37
2.9.2 Gewinnung und Präparation der Proben	37
2.10 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse	39
2.10.1 Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie	39
2.10.2 Gewinnung und Präparation der Proben	39
2.11. RNA-Isolation.....	40
2.11.1 Prinzip der RNA-Isolation.....	40
2.11.2 Durchführung der RNA-Isolation von besiedelter SIS- muc	41
2.11.3 Durchführung der RNA-Isolation von humanem Parotisgewebe.....	43
2.11.4 Durchführung der RNA-Isolation von primären, humanen Speicheldrüsenepithelzellen.....	43
2.11.5 Messung der RNA	44
2.12 cDNA-Synthese.....	44
2.12.1 Prinzip der cDNA-Synthese.....	44
2.12.2 Durchführung der cDNA-Synthese	45

2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.13.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion	45
2.13.2 Gradienten-Polymerasekettenreaktion.....	46
2.13.3 Gelelektrophorese	47
2.13.4 Prinzip der real-time quantitativen Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) ..	48
2.13.5 Durchführung der real-time quantitativen Polymerasekettenreaktion.....	49
2.13.6 Primer-Effizienzbestimmung	51
2.14 Statistische Verfahren	52
3. Ergebnisse.....	52
3.1 Charakterisierung von nativem Speicheldrüsengewebe	52
3.2 Kultivierung von Zellen in 2D-Kultur	54
3.2.1 Kultivierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen	54
3.2.2 Kultivierung der mikrovaskulären Endothelzellen.....	55
3.3 Charakterisierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen in 2D-Kultur	56
3.4 Morphologie und Charakterisierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen auf der SIS-muc.....	57
3.4.1 Wachstumsmorphologie	57
3.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen	61
3.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie.....	67
3.4.4 α -Amylase-Genexpression und Enzymaktivität.....	69
3.5 Gradienten-PCR und Primereffizienzbestimmung	72
4. Diskussion	73
4.1 Charakterisierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen in 2D-Kultur	73
4.2 Charakterisierung der 3D-Kultur humaner Speicheldrüsenepithelzellen und Vergleich mit der 2D-Kultur	75

4.3 Vergleich der 3D-Monokultur humaner Speicheldrüsenepithelzellen mit der 3D-Kokultur mit mikrovaskulären Endothelzellen	77
4.4 SIS-muc und BioVaSc als Matrices für das Tissue-Engineering der menschlichen Speicheldrüse	80
5. Ausblick.....	83
6. Literaturverzeichnis	84
7. Anhang	91
7.1 Material	91
7.1.1 Geräte	91
7.1.2 Verbrauchsmaterial	93
7.1.3 Labormaterial.....	95
7.1.4 Chemikalien und Lösungen.....	96
7.1.5 Medien und Puffer.....	98
7.1.6 Antikörper und Kits	100
7.1.7 PCR-Material	102
7.1.8 Gewebe und Zellen.....	102
7.1.9 Software	103
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	103
7.3 Tabellenverzeichnis	105
7.4 Abkürzungen	106
7.5 Rohdaten	109
8. Danksagung.....	CXIII
9. Lebenslauf.....	CXIV
10. Eidesstattliche Erklärung/Affidavit	CXVII

Zusammenfassung

Eine ausgeprägte Mundtrockenheit, Xerostomie, entsteht häufig durch eine irreversible Funktionseinschränkung der Speicheldrüsen. Diese ist unter anderem durch die Einnahme bestimmter Medikamente, Autoimmunerkrankungen, fortgeschrittenes Alter oder die Bestrahlungstherapie von Tumoren der Kopf-Hals-Region bedingt, wobei letztere eine der häufigsten Ursachen darstellt. Konsequenzen der eingeschränkten Drüsenfunktion sind herabgesetzte Speichelflussraten, eine Reduktion des Mund-pH-Werts, eine veränderte Elektrolyt- und Immunglobulin-Zusammensetzung des Speichels und somit eine Verringerung des Infektionsschutzes. Die resultierenden Komplikationen erstrecken sich von Karies und rezidivierenden Infektionen bis hin zu Pilzbesiedelungen der Mundschleimhaut. Diese schränken die Lebensqualität der Patienten stark ein und führen häufig zu Therapieunterbrechungen. Fast die Hälfte der Patienten leidet unter Depressionen oder psychischen Belastungszuständen. Es gibt wenige Therapieansätze zur Behandlung der postradiogenen Xerostomie: Pilocarpin erhöht zwar die Speichelflussraten, hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Lebensqualität. Die operative Translokation der *Glandula submandibularis* hat den Weg in die klinische Routine noch nicht gefunden, während die intensitätsmodulierte Bestrahlung (IMRT) nicht für jeden Patienten geeignet ist; beide zeigen jedoch einen positiven Effekt auf die Lebensqualität. Gentechnische und stammzellbasierte Ansätze zur Regeneration des Drüsengewebes befinden sich im Experimentalstadium. Somit ergibt sich ein dringender Bedarf an innovativen Optionen zur Behandlung der postradiogenen Xerostomie. Das Tissue Engineering, die Erstellung einer künstlichen Speicheldrüse aus körpereigenen Zellen, böte hier ein potentielles Behandlungskonzept.

Diese Studie soll deshalb untersuchen, ob humane Speicheldrüsenepithelzellen (hSEZ) auf einer Matrix aus dezellularisiertem, porzinem Jejunum, der sogenannten Small intestinal submucosa + mucosa (SIS-muc), kultiviert werden können. Können die Zellen innerhalb der Wachstumsperiode wichtige physiologische Differenzierungsmarker beibehalten? Kann die Produktion von α -Amylase, einem der wichtigsten Enzyme des menschlichen Speichels, erhalten werden? Welchen Einfluss hat die Kokultur mit

mikrovaskulären Endothelzellen (mvEZ)? Und zuletzt: Ist dezellularisierter Schweinedarm eine potentiell geeignete Matrix für das Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse?

Zunächst erfolgte die Entnahme von humanem Speicheldrüsengewebe, woraus hSEZ isoliert wurden. Diese wurden dann sowohl in Mono- als auch in Kokultur mit mvEZ auf die SIS-muc aufgebracht und auf dieser kultiviert. Die SIS-muc wurde aus kurzen Schweinedarm-Segmenten gewonnen, die in einem mehrstufigen Verfahren dezellularisiert wurden. Die besiedelte SIS-muc wurde mittels konventioneller sowie Immunfluoreszenzfärbungen, Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie (REM/TEM) sowie quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) untersucht, darüber hinaus erfolgte die Messung der α -Amylase-Enzymaktivität.

Histologisch sowie in der REM zeigte sich sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur eine konfluente Besiedelung der SIS-muc mit hSEZ. In der Kokultur formten mvEZ einen Monolayer auf der serosalen Matrixseite. Bei der Charakterisierung der hSEZ zeigte sich in den Immunfluoreszenzaufnahmen eine starke Ausprägung von Zytokeratin, α -Amylase und Aquaporin-5 und eine moderate Ausprägung von Claudin-1. Bei der Untersuchung der Funktion der α -Amylase konnte in der Kokultur von hSEZ mit mvEZ eine im Gegensatz zur Mono- und 2D-Kultur signifikant erhöhte Enzymaktivität der α -Amylase nachgewiesen werden. In der qPCR-Analyse der α -Amylase-Genexpression war die 3D-Kultur der 2D-Kultur überlegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Kultur von hSEZ auf der SIS-muc möglich ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen in 3D-Kultur spezifische Differenzierungsmerkmale beibehalten, die in der 2D-Kultur teils verloren gehen und dass hSEZ in Kokultur mit mvEZ eine gegenüber der Monokultur signifikant erhöhte Produktion von α -Amylase aufweisen. Diese Arbeit liefert die Datengrundlage für zukünftige Studien im dynamischen Bioreaktor-Modell (BioVaSc), die auf dem Weg zur klinischen Translation notwendig sind. Somit stellt sie einen wichtigen Schritt in Richtung einer auf Tissue Engineering basierten Therapie der belastenden Xerostomie dar.

Abstract

Xerostomia or dryness of the mouth often results from irreversible loss of function of the salivary glands. This medical condition can either be induced by certain drugs, autoimmune diseases, high age or radiotherapy of head and neck cancer with the latter being one of the most common causes. Impaired glands lead to a decrease in saliva flow rate as well as pH level inside the mouth and cause an alteration in the composition of saliva (e.g. electrolytes, immunoglobulins) lowering its anti-inflammatory capacity. Complications imply caries and recurring infections as well as mycosis of the oral cavity which negatively impact the patients' quality of life, often leading to therapy interruptions. Moreover, almost half of the patients suffer from depression or other mental disorders. The treatment of radiogenic xerostomia is based on only a few therapeutic approaches currently available: Pilocarpin increases saliva flow rate yet does not significantly improve the patients' quality of life or reduce mucositis. Although indicating positive effects on quality of life, operative translocation of the submandibular gland has not yet been established in the clinical routine, while intensity modulated radiotherapy (IMRT) is not suitable for every patient. On the other hand, genetic or stem-cell-based approaches for regeneration of salivary gland tissue are still at an experimental stage. Thus, there is a strong demand for innovative options for the treatment of radiation-induced xerostomia which could potentially be supplied by an approach based on the tissue engineering of the salivary gland using autologous cells.

The aim of this study is to investigate, whether human salivary gland epithelial cells (hSGEs) can be cultured on a scaffold made from decellularized porcine jejunum, the so-called small intestinal submucosa (SIS-muc). Do the cells maintain the expression of certain cellular markers over the given cell culture time? Can the production of α -amylase, a key enzyme of human saliva, be perpetuated? And lastly: Is the SIS-muc an appropriate scaffold for the tissue engineering (TE) of the human salivary gland?

To examine this, human salivary gland tissue was obtained and salivary gland epithelial cells were isolated. The cells were cultured both in mono- and co-culture with

microvascular endothelial cells (mvECs) on the SIS-muc. Colonized SIS-muc was analyzed in H&E and immunofluorescence stainings, scanning- and transmission electron microscopy as well as quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Furthermore, enzyme activity of α -amylase was quantified.

H&E stainings as well as scanning electron microscopy (SEM) revealed a confluent cell layer of hSGECs on the scaffold both in mono- and co-culture. Immunofluorescence stainings indicated a strong expression of cytokeratin, α -amylase and aquaporin-5 and a moderate expression of claudin-1. Enzyme assay revealed that SGECs co-cultured with mvECs yielded a significantly increased activity of α -amylase compared to the monocultured cells. Quantitative PCR (qPCR) indicated an increase in α -amylase gene expression in 3D-culture compared to 2D-culture.

This study shows that hSGECs can successfully be cultured on the SIS-muc and maintain important cellular markers which partly vanish in 2D-culture. Moreover, co-culture with mvECs increased α -amylase enzyme activity of hGECs compared to monoculture. Those results significantly contribute to the base of evidence needed for following studies focusing on dynamic cell culture using the BioVaSc which are necessary to evaluate the possibilities for clinical translation. Thus, this study takes an important step towards a tissue engineering-based therapy of the burdensome xerostomia.

1. Einleitung

1.1 Aufbau der Speicheldrüsen und Funktionen des Speichels

Der Mensch besitzt drei paarige, große Speicheldrüsen, die zusammen mit zahlreichen kleineren Drüsen für die Produktion des Speichels verantwortlich sind. Die größte unter ihnen, die *Glandula parotidea*, produziert serösen, die *Glandula sublingualis* mukösen und die *Glandula submandibularis* gemischt sero-mukösen Speichel. Der muköse Speichel unterliegt einer gleichbleibenden, dauerhaften Produktion und sorgt so für eine ununterbrochene Befeuchtung der Mundhöhle [1]. Die Sekretion serösen Speichels wird physiologisch durch Nahrungsaufnahme oder damit verbundene sensorische Eindrücke - etwa durch das Sehen oder Riechen von Speisen - stimuliert. Hierbei unterliegt die Produktion des mukösen Speichels vorwiegend sympathischer, die des serösen Speichels hingegen parasympathischer Innervation [2]. Der histologische Aufbau der funktionellen Einheiten einer Speicheldrüse ist in Abb. 1 gezeigt.

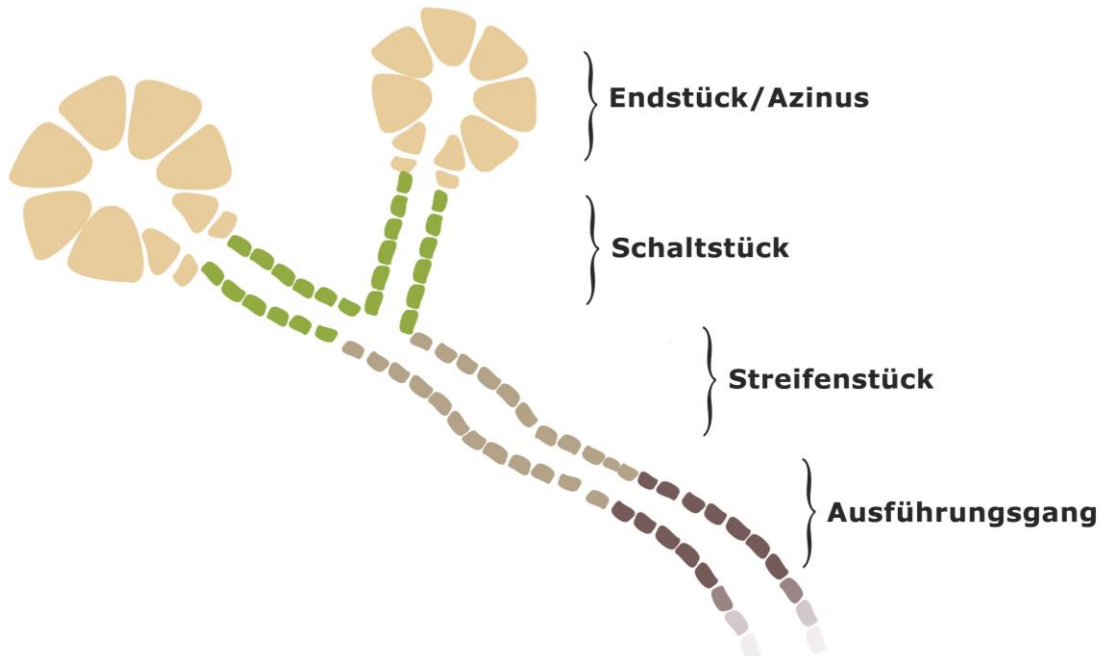


Abb. 1: Schematischer Grundaufbau der funktionellen Einheit der Speicheldrüse (Azinus) mit angeschlossenem Gangsystem.

Die Endstücke, Azini, produzieren als funktionelle Einheiten das Speichelsekret. Dieses wird durch das Gangsystem aus Schaltstück, Streifenstück und Ausführungsgang

transportiert und in seiner Zusammensetzung modifiziert. Zwischen Azini und angeschlossenen Gangsystemen befindet sich Fettgewebe und interstitielles Bindegewebe, in dem versorgende Gefäße und Nerven verlaufen. Die physiologischen Funktionen, die der Speichel erfüllt, sind vielfältig. Beim Verdauungsvorgang bewirkt er die Verdünnung und das Anfeuchten der Nahrung und unterstützt so den Kauvorgang, die Geschmackswahrnehmung, die Entstehung eines Nahrungsbolus und den Schluckvorgang. Der Beginn der enzymatischen Verdauung wird durch die im Speichel enthaltenen Enzyme α -Amylase und Lipase gewährleistet, die Stärke bzw. Fette aufspalten und so für nachfolgende Verdauungsprozesse zugänglich machen [3].

Eine weitere wichtige Funktion des Speichels ist der Schutz der Zähne vor Karies. Neben der ständigen Säuberung der Mundhöhle, die die Konzentration von Bakterien und schädlichen Substanzen (Noxen) reduziert, puffert der Speichel durch das darin enthaltene Bikarbonat Säuren ab und hält den pH-Wert der Mundflora so auf einem Niveau von 6.5-7.4 [3]. Bestimmte Speichelproteine wie Statherin und Histatin hemmen außerdem die Demineralisation des Zahnschmelzes [4].

Auch die Mundschleimhaut wird durch den Speichel geschützt. Sogenannte Muzine reduzieren mechanische Irritationen, indem sie deren Oberfläche gleitfähiger machen und die Wundheilung fördern, außerdem verklumpen sie Bakterien, sodass diese leichter mit dem ständigen Speichelfluss abtransportiert werden können. Darüber hinaus spielen im Speichel enthaltene antifungal (Histatin) bzw. antibakteriell (Lactoferrin, Peroxidase, α -Amylase, Lysozym) wirkende Proteine und das Immunglobulin A (IgA) eine entscheidende Rolle bei der Reduktion der mikrobiellen Besiedelung der Mundhöhle [3].

1.2 Xerostomie und ihre Ursachen

Der Verlust der Speicheldrüsenfunktion resultiert in einer Hyposalivation, also einer Reduktion der Speichelproduktion. Dies führt zur Trockenheit der Mundhöhle, der sogenannten Xerostomie (gr. *xírós* „ausgedörrt, trocken“ und *stóma* „Mund“), die mit weitreichenden Folgen einhergeht: Durch den Verlust der beschriebenen Funktionen des Speichels entwickeln sich Infektionen durch Hefe-Pilze [5] und Bakterien wie

Streptococcus mutans oder Lactobacillus spp. [6]. Die Patienten leiden unter Schmerzen der Mundhöhle und des Rachens und eingeschränkter Kau- und Schluckfunktion. Diese Umstände führen letztendlich zu einer verringerten Nahrungsaufnahme und einer Abnahme der Lebensqualität [7, 8].

Xerostomie kann verschiedene Ursachen haben: Zu den wichtigsten zählen die Bestrahlungstherapie von Kopf-Hals-Tumoren, die Anwendung xerogener Medikamente oder Chemotherapeutika, hohes Alter oder Autoimmun-Erkrankungen wie das Sjögren-Syndrom [9].

1.2.1 Bestrahlung von Kopf-Hals-Tumoren

Zu Kopf-Hals-Tumoren werden maligne Neoplasien des Rachens, der Mundhöhle und des Kehlkopfes gezählt [10]. Im Jahre 2016 erkrankten weltweit ca. 694.000 Menschen an Tumoren von Kopf und Hals, von denen 273.000 verstarben. Auf Männer entfielen dabei ca. 68 % der Neuerkrankungen [11]. In Deutschland betrug die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen im Jahre 2012 ca. 44/100.000 Einwohner [12], in einigen Hochrisikoländern wie Pakistan, Indien oder Sri Lanka stellen Kopf-Hals-Tumoren bei Männern sogar die häufigste Krebsform dar [13]. In über 90% der Fälle handelt es sich hierbei um Plattenepithelkarzinome, die von der Epithelschicht der Schleimhaut der oberen Luft- und Speisewege ausgehen. [14]. Etwa 80% der Plattenepithelkarzinome werden durch den Konsum von Tabak und Alkohol verursacht, wobei die hierin enthaltenen Substanzen in ihrer Kombination ein hohes kanzerogenes Potential aufweisen. Ein weiterer wichtiger und an Bedeutung zunehmender Risikofaktor sind orale Infektionen mit Humanen Papillomaviren (HPV), insbesondere der Typen 16, 18, 31 und 33 [13].

Die Therapie von Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals besteht in deren operativer Entfernung. Hierbei werden jedoch häufig nicht alle Tumorreste entfernt. Um Mikrometastasen und ggf. Tumorreste, welche intraoperativ nicht komplett reseziert werden konnten, therapeutisch zu erfassen, erfolgt in Abhängigkeit vom Tumorstadium eine postoperative Bestrahlungstherapie, die wiederum mit platinbasierter Chemotherapie kombiniert wird. Die Azinuszellen der Speicheldrüse sind sehr

strahlensensibel und werden bei der Radiotherapie schon bei geringen applizierten Dosen geschädigt. Bereits Dosen von ca. 25 Gy vermögen es, die Speichelflussrate auf 25% ihres Ausgangswertes zu reduzieren [15]. Ab einer Strahlendosis von ca. 50 Gy ist die Schädigung sehr häufig irreversibel und führt über eine gestörte Zusammensetzung und stark verminderte Produktion des Speichels zu einer chronischen Xerostomie [7]. Da die für eine effiziente Therapie notwendigen Strahlendosen im direkten Zielgebiet in der Regel zwischen 50-70 Gy liegen, sind sehr viele der therapierten Patienten hiervon betroffen.

1.2.2 Xerogene Medikamente und Chemotherapie

Es gibt eine Vielzahl von Medikamenten, bei denen ein xerogener Effekt nachgewiesen werden konnte. Vor allem sind dies solche Medikamente, die eine anticholinerge Wirkkomponente aufweisen - das heißt, dass sie die Konzentration oder die Wirkung des für das parasympathische System wichtigsten Neurotransmitters Acetylcholin reduzieren. Da der Parasympathikus für die gustatorisch induzierte Sekretion serösen Speichels verantwortlich ist, wird diese somit durch anticholinerg wirksame Medikamente gehemmt. Zu den wichtigsten xerogenen Wirkstoffgruppen zählen Anticholinergika gegen die sogenannte „Überaktive Blase“ (Tropiumchlorid, Tolteronid), Antidepressiva unterschiedlichster Wirkstoffgruppen (Mirtazapin, Escitalopram, Sertralin, Imipramin) und andere Psychopharmaka (Pregabalin, Lisdexamfetamin). Überdies können eine Vielzahl anderer Medikamente aus den unterschiedlichsten Wirkstoffgruppen xerogen wirken. Im Unterschied zu der postradiogenen Xerostomie ist bei der medikamentös induzierten die Ausprägung eher gering- bis mittelgradig und somit einhergehend mit einer geringeren Beeinträchtigung der Kau- und Schluckfunktion. Der Verlauf der Xerostomie über die Dauer der Einnahme kann sehr variabel sein: Teilweise zeigt sie sich im Verlauf rückläufig, teilweise verstärkt sie sich [16].

1.2.3 Sjögren-Syndrom

Als Syndrom wird in der Medizin ein Komplex verschiedener Symptome bezeichnet, die typischerweise gleichzeitig und gemeinsam auftreten. Das Sjögren-Syndrom gehört zu den Kollagenosen, einer Gruppe von Autoimmunerkrankungen, und führt zu einer

allmählichen Zerstörung der Speichel- und Tränendrüsen. Der hieraus resultierende, charakteristische Symptomkomplex aus Xerostomie und Xerophthalmie wird Sicca-Syndrom genannt. Zwar können bei vielen der betroffenen Patienten spezifische Autoantikörper gegen Strukturen der Tränen- und Speicheldrüsen nachgewiesen werden - die genaue Pathogenese der maßgeblich von CD4⁺-Lymphozyten getragenen Autoimmunadenitis, die zur irreversiblen Zerstörung der Drüsen führen kann, ist jedoch trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet bis heute nicht eindeutig geklärt [17].

1.3 Prävention der Xerostomie nach Bestrahlung

1.3.1 Intensitätsmodulierte Radiotherapie

Die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) ermöglicht es, das Tumor-Zielvolumen mit einer ausreichend hohen, therapeutisch wirksamen Dosis zu bestrahlen, beim umgebenden Gewebe jedoch eine Reduktion der Strahlendosis im Vergleich zur konventionellen Radiotherapie zu erreichen. In mehreren Studien wurde klargelegt, dass bei der Anwendung von IMRT zur Therapie von Tumoren der Kopf-Hals-Region Xerostomie seltener auftritt, die Erholung der Speichelsekretion besser verläuft und sogar die Lebensqualität verbessert werden konnte [18, 19].

1.3.2 Amifostin-Therapie

Eine weitere Möglichkeit, die Strahlendosis im Umgebungsgewebe zu reduzieren, ist der Einsatz radioprotektiv wirksamer Substanzen. Die seit ca. 30 Jahren am meisten verwendete ist Amifostin, zu dessen Wirkung hinsichtlich der Bestrahlungsfolgen eine kontroverse Studienlage existiert: Einige Studien ergaben, dass die Applikation während der Strahlentherapie das Risiko für das Auftreten akuter und chronischer Xerostomie reduzieren kann [20, 21], andere konnten keinen protektiven Effekt nachweisen [22, 23]. Weiterhin wurde eine mögliche, ungewollte Radioprotektion des Tumors untersucht, die den therapeutischen Effekt der Bestrahlung abschwächen könnte. Hierfür konnte jedoch kein Anhalt gefunden werden [24]. Die wichtigsten Nebenwirkungen von Amifostin sind Übelkeit, Erbrechen und eine vorübergehende Absenkung des Blutdrucks. Zwar kommt eine aktuelle Bewertung der Studienlage zu dem Ergebnis, dass sich das Auftreten und das Ausmaß der Nebenwirkungen in einem

tolerablen Maß bewegen [25], es sind jedoch auch schwere Nebenwirkungen beschrieben worden [26].

1.4 Angewandte Therapieverfahren der Xerostomie

1.4.1 Medikamentöse Therapie

Pilocarpin ist das wichtigste und am meisten eingesetzte Medikament zur Behandlung der Xerostomie. Es ist ein sogenanntes direktes Parasympathomimetikum, da es als Analogon des Neurotransmitters Acetylcholin direkt an M-Acetylcholinrezeptoren bindet und so die Aktivität der Speicheldrüsen erhöhen soll. Für die Pilocarpin-Therapie konnte sowohl bei postradiogener Xerostomie [27, 28] als auch bei durch das Sjögren-Syndrom bedingter Xerostomie [29] eine Verbesserung des Speichelflusses und der Kau- und Schluckvorgänge gezeigt werden. Dennoch konnte keine signifikante Verbesserung der Lebensqualität oder Reduktion der oralen Infektionen erreicht werden [30]. Darüber hinaus ist der Einsatz von Pilocarpin durch Nebenwirkungen und Kontraindikationen beschränkt: Bei Patienten mit schwerem Asthma, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder einem Engwinkelglaukom sollte es nicht zur Anwendung kommen.

1.4.2 Operative Verfahren

Eine weitere Möglichkeit, die Speicheldrüsen vor den Strahlenfolgen zu schützen besteht darin, sie vor der Therapie aus dem Bestrahlungsfeld heraus zu verlagern. An der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen in Würzburg wurde im Jahr 2012 hierzu eine Pilotstudie durchgeführt. Bei 6 Patienten, bei denen eine Bestrahlungstherapie der Kopf-Hals-Region notwendig war, wurde eine der Submandibulardrüsen explantiert und in den Unterarm implantiert. Zwei bis drei Monate nach Beendigung der Strahlentherapie erfolgte die operative Rückverlagerung der Drüse. Es konnte eine verbesserte Speichelproduktion und eine damit einhergehende Reduktion der Xerostomie festgestellt werden [31].

1.4.3 Alternativtherapeutische Ansätze

Die einzige alternativmedizinische Behandlungsmethode, für die bis dato ein positiver Effekt auf die postradiogene Xerostomie nachgewiesen werden konnte, ist die Akupunktur. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die zu diesem Effekt führen, sind

bisher nicht ausreichend geklärt. Eine Studie von Wong et al. konnte zwar eine signifikante Verringerung der postradiogenen Xerostomie bestätigen, eine Verbesserung der Lebensqualität blieb jedoch aus [32].

1.5 Experimentelle Ansätze zur Behandlung der Xerostomie

1.5.1 Stammzellbasierte Regenerationsstrategien

Unter den experimentellen Ansätzen zur Behandlung der Xerostomie finden sich viele, in denen stammzellbasierte Verfahren zum Einsatz kommen. Im Jahr 2013 gelang es Ogawa et al., aus mesenchymalen und epithelialen Stammzellen, die aus Mäuseembryonen gewonnen wurden, einen sogenannten Organkeim herzustellen, der sich nach mehrtätiger *in vitro*-Kultur und nachfolgender Implantation in Defektmäuse, denen im Alter von 7 Wochen alle großen Speicheldrüsen operativ entfernt worden waren, zu einer Speicheldrüse entwickelte [33]. Die meisten speicheldrüsenspezifischen Funktionen konnten die auf diese Weise entwickelten, artifiziellen Drüsen ausführen. Zwar bewegten sich die Messungen der transplantierten Mäuse bei einigen Parametern wie beispielsweise der oralen Bakterien-Besiedelung oder der Speichelflussrate nicht auf dem Niveau der Mäuse mit physiologischen Speicheldrüsen, doch die Verbesserung im Vergleich zu Defektmäusen war signifikant.

Ein weiterer Ansatz liegt darin, durch Applikation von mesenchymalen Stammzellen (MS) die Speicheldrüsenfunktion zu verbessern. In mehreren Studien mit Mausmodellen zur postradiogenen Xerostomie, in denen die Applikation der Stammzellen per Direktinjektion in die Speicheldrüse erfolgte, konnte eine signifikante Steigerung des Speichelflusses erreicht werden. Histologisch zeigten sich funktionelle Azini und eine gesteigerte Gefäßinjektion [34-36]. Weitere Studien beschäftigen sich mit der Stammzelltherapie von Xerostomie, die durch das Sjögren-Syndrom bedingt ist: Hier erfolgte, zunächst im Mausmodell, die Applikation der MSZ intravenös. Es konnten ein verbesserter Speichelfluss und eine reduzierte Entzündungsreaktion innerhalb des Speicheldrüsengewebes nachgewiesen werden [37, 38]. In einer Anschlussstudie wurden 11 Patienten mit Xerostomie über einen Zeitraum von 2 Wochen MSZ

intravenös appliziert. Bei allen Patienten zeigte sich im Anschluss ein verbesserter stimulierter und unstimulierter Speichelfluss [37].

Die Arbeitsgruppe von Lombaert beschrieb, dass die durch Applikation von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) ausgelöste Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark eine Möglichkeit darstellt, die Funktion bestrahlter Speicheldrüsen von Ratten in Bezug auf die Produktion von Speichel positiv zu beeinflussen [39]. Jedoch beruht der beschriebene Effekt weder auf einer Transdifferenzierung von Stammzellen zu Azinuszellen noch auf einem direkten Effekt von G-CSF auf die Speicheldrüsenzellen. Die beobachtete Verbesserung des Speichelflusses erfolgt vermutlich auf Grund einer zytokinmedierten Signalkaskade mit gewebspezifischen Stammzellen.

In einer späteren Studie konnten Lombaert et al. zeigen, dass durch die Transplantation von c-kit-positiven Stammzellen eine morphologische und funktionelle Regeneration strahlengeschädigter Speicheldrüsen bei Mäusen erzielt werden konnte [40]. Während die Stammzellen hier aus der Zellkultur primärer Speicheldrüsenzellen isoliert und expandiert wurden, konnten Sumita et al. auch mit Zellen, die aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen wurden, eine Verbesserung der Speicheldrüsenfunktion bestrahlter Mäuse erreichen [41].

Eine jüngere Studie konnten zeigen, dass pluripotente Progenitorzellen der Zahnfollikel als mögliche Quelle zur Gewinnung von Speicheldrüsenepithel-ähnlichen Zellen dienen könnten [42]. Des Weiteren scheinen induzierte, pluripotente Stammzellen (iPS) einen positiven Einfluss auf Differenzierung und Regeneration von Speicheldrüsenepithelzellen zu haben [43]. Dies sind Zellen, die in ihrem Potential zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen embryonalen Stammzellen ähneln, jedoch durch Einbringung bestimmter Transkriptionsfaktoren artifiziell aus nicht-pluripotenten, ausdifferenzierten Primärzellen gewonnen werden [44-46].

1.5.2 Getherapeutische Ansätze

Es gibt verschiedene Ansätze zur getherapeutischen Regeneration bei postradiogener Xerostomie, die sich vor allem auf die Transfektion bestimmter Gene über adenovirale

Vektoren konzentrieren. Diese ermöglichen es, transgene DNA in die Zellen eines bestimmten Zielgewebes einzubringen und so deren Genexpression zu ändern. Die veränderte Genexpression soll somit eine Regeneration des betreffenden Gewebes ermöglichen. Ein Ziel der Gentransfektion war beispielsweise das duktales Gangsystem von bestrahlten Unterkieferspeicheldrüsen in Ratten. In dessen Zellen führten Delporte et al. über einen adenoviralen Vektor das AQP-1-Gen ein [47]. Physiologisch initiiert dieses über die Expression des Proteins AQP-1 einen gesteigerten Fluss von Wasser ins duktales System der Speicheldrüse [48, 49]. Tatsächlich führte die Transfektion des Gens bei den bestrahlten Ratten zu einer Normalisierung der Speichelproduktion.

Die Schädigung des Gefäßsystems hat einen großen Anteil an dem durch Bestrahlung induzierten Funktionsverlust der Speicheldrüse. Daher transfizierten Cotrim et al. wiederum über einen adenoviralen Vektor VEGF- und FGF-Gene in das Gefäßsystem bestrahlter Mäuse. VEGF (Vascular endothelial growth factor) und FGF (Fibroblast growth factor) sind Gene für Wachstumsfaktoren, die maßgeblich an der Angiogenese beteiligt sind. Auch hier konnte bei den behandelten Mäusen eine Erhöhung der Speichelproduktion auf 70-80% des physiologischen Ursprungswerts vor Bestrahlung erreicht werden [50].

Adenoviralen Vektoren ist gemeinsam, dass sie das Transgen nicht in die DNA der Zielzellen integrieren und somit nur eine vorübergehende Expression desselben bewirken. Folglich wäre beim Einsatz adenoviraler Vektoren eine regelmäßige Re-Applikation erforderlich, die jedoch häufig durch eine bereits bestehende oder applikationsbedingte Bildung einer antiadenoviralen Immunität limitiert werden würde [51].

1.5.3 Tissue Engineering

Unter Tissue Engineering (TE) wird nach der Definition der amerikanischen National Science Foundation (NSA) von 1988 ein Forschungsfeld verstanden, auf dem Bio- und Ingenieurwissenschaften interdisziplinär daran arbeiten, die Beziehungen von Struktur und Funktion in gesunden und pathologisch veränderten Geweben besser zu verstehen und die Entwicklung biologischer Substitute zur Wiederherstellung, Erhaltung oder

Verbesserung der Gewebefunktion voranzutreiben. Das Tissue Engineering stellt eine Perspektive für zwei bisher nicht hinreichend gelöste medizinische Probleme dar: Zum einen könnte dem wachsenden Bedarf menschlicher Spenderorgane begegnet werden, der sich unter anderem aus einer steigenden Lebenserwartung und einer erhöhten Inzidenz klassischer Zivilisationserkrankungen wie Diabetes Typ II oder alkoholbedingten Lebererkrankungen ergibt [52]. Außerdem wäre bei einem körpereigenem Gewebs- und Organersatz keine Abstoßungsreaktion zu erwarten. Dadurch würde die Notwendigkeit einer oftmals nebenwirkungsreichen immunsuppressiven Therapie, die bis dato bei Transplantationen notwendig ist, entfallen.

Eine gängige Methode zur Generierung von Gewebe, das strukturell und funktionell dem physiologischen ähnelt, ist die Verwendung von Trägerstrukturen, auch Scaffolds oder Matrices genannt, die aus biodegradierbaren Bestandteilen aufgebaut sind. Die besiedelten Scaffolds können unterschiedlich eingesetzt werden. Soll ein Gewebe- oder Organersatz erfolgen, werden die vom Patienten gewonnenen Zellen ausgesät und *in vitro* kultiviert. Nach entsprechendem Zellwachstum erfolgt die Reimplantation und die weitere Reifung des Gewebeersatzes, während die Matrix abgebaut wird [53]. Diese Methodik am Beispiel der Verwendung von Primärzellen ist in Abb. 2 skizziert.

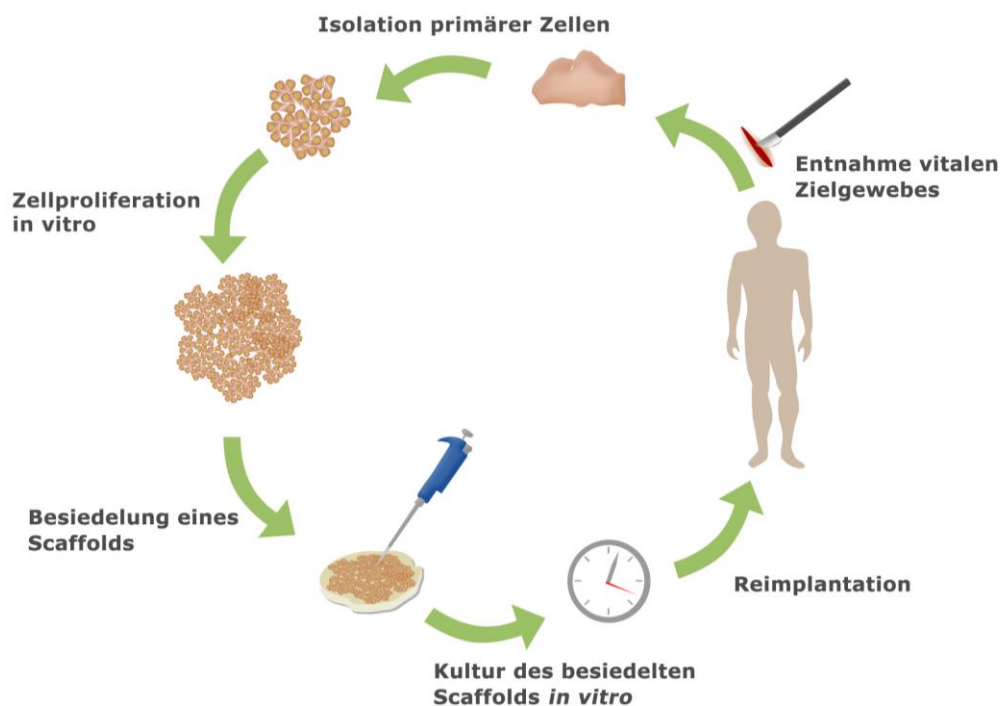


Abb. 2: Prinzip des Tissue Engineering zum Ersatz von Organen oder Gewebe.

Primärzellen sind zwar ein häufig verwendeter Zelltyp beim Tissue Engineering, doch stellen diese neben embryonalen und mesenchymalen Stammzellen sowie induzierten pluripotenten Stammzellen nur eine der möglichen Quellen für das benötigte Zellmaterial dar.

Neben dem Organ- und Gewebersatz ist eine weitere wichtige Einsatzmöglichkeit des Tissue Engineering die Entwicklung biologischer Testsysteme: Werden die Scaffolds mit Tumorzellen besiedelt, können an ihnen neue Therapiemöglichkeiten getestet werden. Durch Besiedelung mit Primärzellen hingegen kann physiologisches Gewebe imitiert werden, welches beispielsweise für Infektions-Studien genutzt werden kann, die neue Erkenntnisse über Pathomechanismen liefern. Exemplarisch für auf Tissue Engineering basierenden Testsystemen seien hier ein kürzlich entwickeltes Luftröhrenmodell [54] sowie ein Tumormodell für Lungenkrebs [55] genannt.

Aufgrund der beschriebenen, bisher unzureichenden Therapierbarkeit der Xerostomie, sei sie durch Bestrahlungstherapie oder andere Ursachen bedingt, rückt auch hier der Organersatz durch Tissue Engineering als mögliche Behandlungsoption in den Fokus. Der erste hierzu notwendige Arbeitsschritt, nämlich die Isolation und Kultivierung von humanen Speicheldrüsenepithelzellen (hSEZ), die Patienten entnommen werden, wurde von Dardick et al. bereits 1993 erstmals beschrieben [56]. Hierbei handelt es sich um diejenigen Zellen, die – je nach Differenzierung - für die zentralen Organfunktionen einer Drüse, nämlich die Produktion von Sekret und dessen Exkretion, verantwortlich sind. Bucherer et al. besiedelten im Jahre 2002 Microcarrier mit hSEZ, wobei jedoch weniger als die Hälfte der Zellen α -Amylase produzierten und diese Produktion über die Zeit noch weiter abnahm [57]. Außerdem wurde die Kultivierung auf polymerbasierten Scaffolds getestet, für die nach Implantation in Mäuse die Expression speicheldrüsenpezifischer Marker und die Produktion von α -Amylase nachgewiesen werden konnte [58]. Maria et al. erreichten auf Matrigel eine 3D-Kultur von hSEZ, bei der die wichtige Differenzierungsmerkmale des Speicheldrüsenepithels ausgeprägt wurden [59]. Matrigel ist eine lösliche Trägersubstanz (Hydrogel) für Zellen, die Proteine der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran enthält. Aufgrund der Gewinnung aus Maus-Sarkomen kommt dieses jedoch nicht für die potentielle Anwendung im

Menschen in Frage. Nam et al. konnten -ebenfalls im Mausmodell- zeigen, dass mit Laminin-1-Peptiden konjugiertes Fibrinogen als Trägerstruktur Potential zur Regeneration beschädigten Speicheldrüsengewebes aufweist [60].

Eine weitere Methode zur Gewinnung möglicher Matrices für das Tissue Engineering ist die Dezellularisierung bestehender Gewebestrukturen, ein Beispiel hierfür stellt der Darm da. Die Darmwand von Säugetieren besteht aus verschiedenen Schichten: Die Grenzschicht der Innenseite des Darms, die mit dem Verdauungsbrei in Kontakt tritt, wird Mukosa genannt, die Grenzschicht der Außenseite Serosa. Die Matrix SIS (small intestinal submucosa), die aus dem Dünndarm von Schweinen gewonnen wird, erfüllt die wichtigsten Voraussetzungen für das Tissue Engineering: Sie ermöglicht Zellmigration und -differenzierung [61, 62] und kann vom Zielorganismus absorbiert werden [63]. Im Gegensatz zur klassischen SIS bleibt bei der SIS-muc (small intestinal submucosa + mucosa) die Mukosa erhalten, bevor die Dezellularisierung stattfindet, sodass das entsprechende Extrazellulärmatrixgerüst mit Basallaminakomponenten bestehen bleibt und für die Besiedelung zur Verfügung steht [64].

1.6 Grundzüge der Zellkultur

Bei der Zellkultur lässt sich grundsätzlich zwischen 2D-Kultur und 3D-Kultur unterscheiden. Bei der 2D-Kultur werden klassischerweise Kulturgefäße mit einer planen Oberfläche verwendet, die 3D-Kultur basiert auf der Verwendung von Matrices, die eine dreidimensionale Ultrastruktur aufweisen [65]. Eine weitere Unterscheidung kann zwischen statischer und dynamischer Zellkultur getroffen werden, wobei bei letzterer das Zellkulturmedium kontinuierlich im Kulturgefäß bewegt bzw. ausgetauscht wird [66]. Auch hinsichtlich der verwendeten Zellen kann eine Differenzierung stattfinden: Bei einer Monokultur wird ein einzelner Zelltyp verwendet, bei einer Kokultur die Kombination zweier oder mehrerer Zelltypen. In dieser Arbeit wurde die statische 3D-Kultur humaner Speicheldrüsenepithelzellen auf der SIS-muc sowohl in Monokultur als auch in Kokultur mit mikrovaskulären Endothelzellen mit der statischen 2D-Kultur humaner Speicheldrüsenepithelzellen verglichen.

1.7 Zielsetzung

Die bisherigen Therapieoptionen der postradiogenen Xerostomie sind unzureichend. Die vorliegende Arbeit soll daher untersuchen, in wieweit die SIS-muc eine geeignete Matrix für das Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse darstellt. Als Vergleichsreferenz dient in allen Versuchen die 2D-Kultur der hSEZ.

Endothelzellen scheinen eine wichtige Rolle für die Funktionserhaltung von Speicheldrüsen einzunehmen [50]. Daher soll untersucht werden, ob die Kokultur mit mvEZ sich hinsichtlich der untersuchten Parameter signifikant von der Monokultur auf der SIS-muc unterscheidet.

Hierzu soll zunächst eruiert werden, ob die Zellkultur von hSEZ auf der SIS-muc möglich ist. Das Wachstumsverhalten der Zellen wird mittels konventionellen histologischen Färbungen und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen analysiert.

Nachfolgend soll untersucht werden, ob und in welcher Intensität wichtige gewebsspezifische Differenzierungsmarker und Zellcharakteristika über eine Zellkulturdauer von 2 Wochen ausgeprägt werden. Hierzu erfolgen Immunfluoreszenz-Analysen und eine Aufarbeitung der Zellultrastrukturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

Die Produktion des Enzyms α -Amylase gehört zu den wichtigsten physiologischen Funktionen der menschlichen Speicheldrüse. Um die Enzymaktivität der α -Amylase in den verschiedenen Ansätzen quantitativ vergleichen zu können, wird ein photometrisches Enzym-Assay durchgeführt. Darüber hinaus erfolgt die Auswertung der Expression des entsprechenden Gens mittels real-time quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen dazu dienen, die Biokompatibilität der hSEZ mit der SIS-muc zu überprüfen. Abschließend soll bewertet werden, ob eine dynamische Kultur im Bioreaktormodell mit der Biological Vascularized Scaffold (BioVaSc), die ebenfalls porzinem Jejunum entstammt, als nächster Schritt in Richtung eines potentiellen Gewebersatzes sinnvoll erscheint.

2. Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden lassen sich grob in drei Arbeitsphasen unterteilen (Abb. 3):

- 1) Gewebegewinnung mit Isolation und Amplifikation der primären Zellen sowie Erstellung der Matrix SIS-muc aus dezellularisiertem, porzinem Jejunum.
- 2) Aussäen der Zellen und Zellkultur auf der SIS-muc sowie als Referenzstandard in der Zellkulturflasche.
 - a. Analyse des Wachstumsverhaltens mittels konventionell-histologischer Färbungen sowie Rasterelektronenmikroskopie (REM).
 - b. Untersuchung spezifischer Differenzierungsmerkmale und Zellcharakteristika mittels Immunfluoreszenz und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).
 - c. Überprüfung der Zellfunktion anhand der Genexpression und Enzymaktivität von α -Amylase.

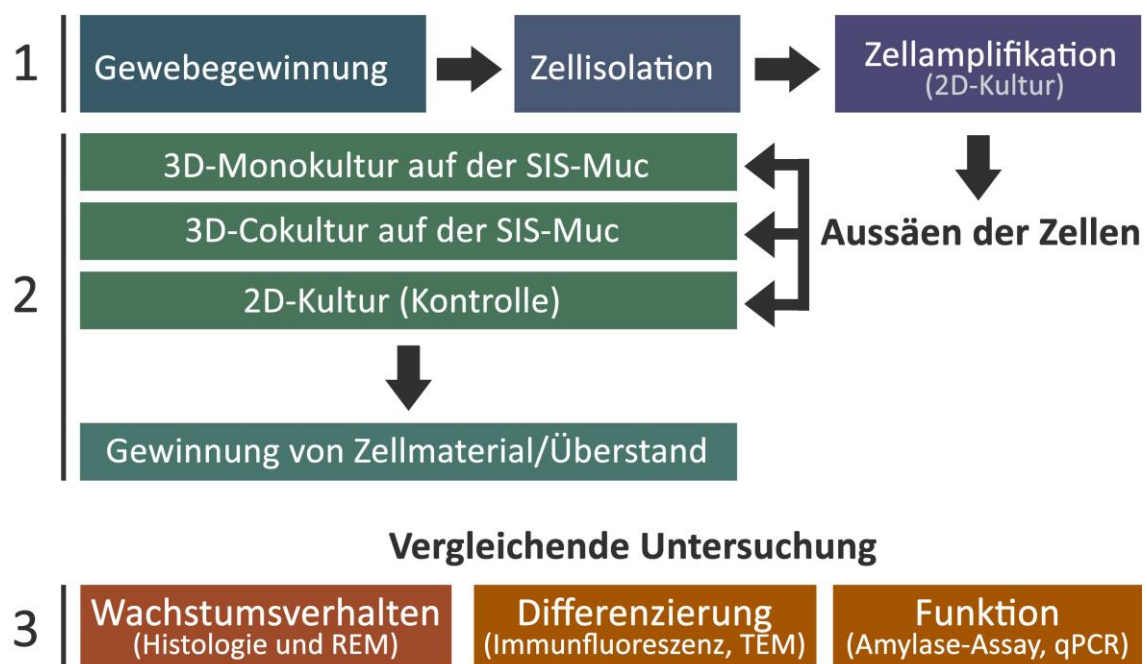


Abb. 3: Zusammenfassung der Methodik zur Evaluation der SIS-muc als Matrix für das Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse.

2.1 Isolation von primären Zellen

Alle Patienten bzw. deren gesetzliche Vertreter willigten nach ausreichender Bedenkzeit schriftlich in die Entnahme der Biopsate und die weitere Verwendung der Zellen ein. Die im Rahmen der Studie durchgeführte Gewinnung von primären, humanen Speicheldrüsenepithelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen wurde durch die Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg genehmigt (Ethikantragsnummer 16/06).

2.1.1 Isolation von humanen Speicheldrüsenepithelzellen aus OP-Präparaten

Im Rahmen der operativen Entfernung benignen Speicheldrüsentumore wurden 2-3 Präparate mit einer Größe von ca. 1-5 cm³ entnommen und in physiologische 0,9%ige Kochsalzlösung (B. Braun, Melsungen, D) überführt.

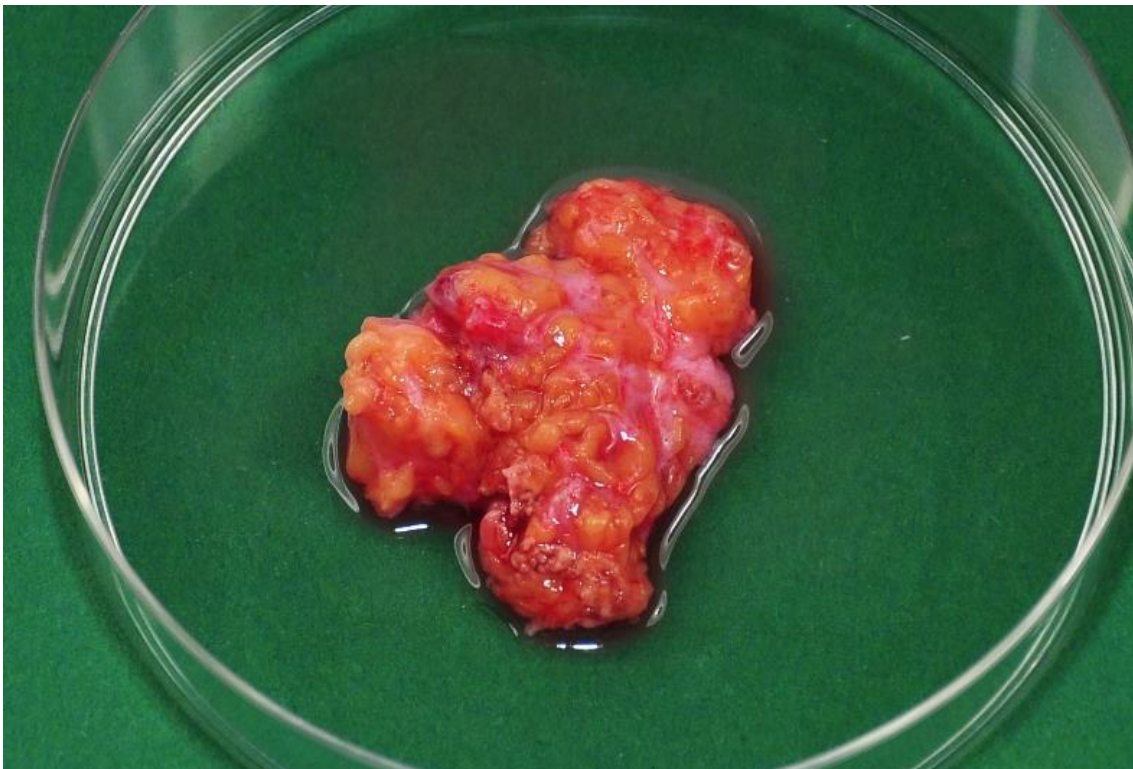


Abb. 4: Nativpräparat aus der humanen Ohrspeicheldrüse (Ø90 mm Petrischale).

Nach Transport in die Sicherheitswerkbank (Sicherheitswerkbank HERAsafe, Thermo Electron LED, Langenselbold, D) erfolgte zunächst eine dreimalige Waschung in einer Petrischale (Greiner Bio-One, Frickenhausen, D) mit je 10 ml Dublecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life technologies, Carlsbad, USA), welches mit 1% Penicillin-

Streptomycin (Penstrep, Biochrom, Berlin, D) und 1% Fungizone (Amphotericin B, Life technologies) versetzt war (Abb. 4). Hierdurch sollten eventuelle bakterielle bzw. fungale Kontaminationen eliminiert werden. Die gewaschenen Präparate wurden in einer neuen Petrischale mit einem sterilen Skalpell (Bayha, Tuttlingen, D) in ca. 1 mm³ große Stücke, sogenannte Monoorgankulturen (MOK), zerteilt. Dabei war darauf zu achten, dass zur Vorbeugung einer späteren Fibroblasten-Kontamination das Bindegewebe vollständig entfernt und ausschließlich Drüsengewebe für die Erstellung der MOKs verwendet wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline mit Mg und Ca, Sigma-Aldrich, München, D) erfolgte die Platzierung der MOKs in eine 24er-Zellkultur-Platte (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, CH) unter Verwendung einer sterilen Pinzette (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, D), sodass pro Well ein MOK vorhanden war. Nach Einsetzen der MOKs in die Zellkultur-Platte konnten die Wells mit 250 µl Airway epithelial cell medium (AECM, PromoCell, Heidelberg, D) befüllt werden. Die Wellplatte wurde in den Zellkulturschrank (BBD 6220: 37 °C, 5 % CO₂, Heraeus, Hanau, D) überführt und das Zellmedium in einem zweitägigen Intervall gewechselt. Hierzu wurde zunächst die Wellplatte in Augenschein genommen und auf makroskopisch sichtbare Veränderungen überprüft. Danach erfolgte die lichtmikroskopische Inspektion der einzelnen Wells, wobei die Zelldichte der hSEZ, der Fibroblastenanteil sowie mögliche Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze untersucht wurden (Lichtmikroskop 473028, Zeiss, Oberkochen, D). Zuletzt wurde mit einer sterilen, an das Absaugsystem „Vacuboy“ (Integra Biosciences, Fernwald, D) angeschlossenen Glaspipette (Brand, Wertheim, D) das Medium aus den Wells entfernt und durch die gleiche Menge frischen Mediums ersetzt. Das Passagieren der Zellen erfolgte, wenn die aus dem MOK ausgesprossenen Zellen ca. 80 % der Wellfläche bedeckt hatten.

2.1.2 Isolation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen

Die innerste Wandschicht von Blut- und Lymphgefäßen wird durch sogenannte Endothelzellen gebildet. Da die dickste Hautschicht des Menschen, die Dermis, ein Gefäßgeflecht enthält, lassen sich aus dieser durch verschiedene Lösungs- und Inkubationsschritte mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEZ) isolieren [67].

Hierfür dienten in dieser Arbeit Hautbiopsate aus dem Präputium juveniler Spender, wobei zwischen OP und Isolation nicht mehr als 2 Tage lagen. Die Lagerung der Biopsate bis zur Zellisolation erfolgte bei 4° C. Der Transport der Biopsate erfolgte in PBS⁺+1 % PenStrep.

Die Isolation der mVEZ erfolgte durch den Lehrstuhl Tissue Engineering & Regenerative Medizin (TERM), die Zellkultur nach Auftauen durch den Autor dieser Arbeit.

Als Sterilkontrolle wurden zunächst 3 ml des Mediums, in dem die Biopsate vom Ort der Operation zum Labor transportiert wurden, in eine 25 cm²-Zellkulturflasche (TPP Techno Plastic Products) überführt, über Nacht im Zellkulturschrank inkubiert und am Folgetag lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Bei Vorliegen einer Kontamination wurden die am Vortag hergestellten Biopsatstreifen in mehreren Waschschrritten gespült. Konnte nach nächtlicher Inkubation im Zellkulturschrank am Folgetag die Kontamination immer noch nachgewiesen werden, wurden die Biopsatstreifen verworfen. Die Isolation der Zellen erfolgte nach dem in Tab. 1 dargestellten Standardprotokoll des Lehrstuhls TERM.

Tab. 1: Ablauf der Endothelzellisolation.

Schritt	Verwendete Lösungen/Medien
Spülung in der Petrischale	PBS ⁻ (Phosphate Buffered Saline ohne Mg und Ca, Sigma-Aldrich)
Entfernung von Fettgewebe, Bindegewebe und Haaren mit dem Skalpell	
Spülung in der Petrischale	PBS ⁻
Zerschneiden des Biopsats in 2-3 mm breite Streifen mit dem Skalpell	
Spülung in der Petrischale	PBS ⁻
Bedecken und Inkubieren der Biopsatstreifen bei 4° C über Nacht	Dispase-Lösung (Life technologies)
Absaugen der Dispase-Lösung und Hinzugeben von 10 ml PBS ⁻ -Lösung	

Entfernen der Epidermis mit der Pinzette (Glaswarenfabrik Karl Hecht)	
Spülung	10 ml Versene®-Lösung (Life technologies) / 6 cm ² Dermis-Stück
Inkubation im Zellkulturschrank für 40 min	10 ml 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung (Life technologies) / 6 cm ² Dermis-Stück
Abstoppen der Enzymreaktion	DMEM +10 % FCS (Linaris, Wertheim-Bettingen, D)
Ausstreichen der Dermisstücke mit dem Skalpell (achtmal, von allen Seiten)	
Überführen der Zellsuspension über Zellsieb in 50 ml-Zentrifugenröhrchen	
Ausspülen des Siebs und der Petrischale (dreimal)	VascuLife®-Medium (CellSystems, Troisdorf, D)
Zentrifugieren bei 1200 rpm für 5 min	
Resuspendieren des Pallets	2 ml VascuLife®-Medium
Zellzählung	

2.2 Zellkultur

Die Zellkulturarbeit erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (NU-425-600 E, Nuair, Plymouth (USA)). Deren Sterilität wurde durch vorherige Oberflächendesinfektion mit einem geeigneten Flächendesinfektionsmittel (Descosept, Seidel Medipool, Reichertshofen, D) und eine 10-minütige Latenzzeit zwischen Einschalten der Werkbank und Arbeitsbeginn gewährleistet. Die Zellkultur erfolgte in Zellkulturschränken mit einer Innentemperatur von 37° C und einer CO₂-Konzentration von 5 %.

Zur Zellkulturarbeit wurden ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien verwendet. Werkzeuge oder Materialien zur Mehrfachverwendung wurden sterilisiert. Das Hinzufügen spezifischer Bestandteile der Zellkulturmedien erfolgte unter sterilen Bedingungen. Metallische Komponenten wurden heißluftautoklaviert.

Der Mediumswechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Dabei erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen unter Berücksichtigung des Wachstums, der Morphologie und potentieller Kontaminationen.

2.2.1 Passagieren von Zellen

Ist die Wachstumsfläche eines Zellkulturgefäßes vollständig durch Zellen bedeckt, spricht man von einem konfluenten, geschlossenen Monolayer. In diesem Zustand sinkt die Proliferationsrate insbesondere bei adhärennten Zellen, die auf dem Boden des Kulturgefäßes haften, stark ab, was zum Absterben der Kultur führen kann. Daher werden die Zellen in einem subkonfluenten Zustand enzymatisch gelöst, in eine Suspension überführt, verdünnt und in reduzierter Konzentration neu ausgesät. Ein für das Ablösen verwendetes Enzym ist das aus dem Dünndarm stammende Verdauungsenzym Trypsin. Es spaltet mit seinem katalytischen Zentrum extrazelluläre Zellproteine, die unter anderem für die Haftung der Zellen verantwortlich sind [68]. Solange die Einwirkzeit wenige Minuten nicht überschreitet, entsteht hierbei in der Regel kein Zellschaden. Schwer ablösbare Zellen müssen zusätzlich mit EDTA vorbehandelt werden, einem Komplexbildner, der durch die Komplexbildung von Magnesium (Mg) und Calcium (Ca) die Zell-Zell-Verbindungen schwächt und somit ein Abkugeln der Zellen bewirkt, die die Ablösung vereinfacht. Außerdem begünstigt es die Aktivität des nachfolgend eingesetzten Trypsins. Nach Ablösung und Resuspendieren der Zellen kann durch die Zentrifugation eine Trennung der festen zellulären Bestandteile und des flüssigen Ablösepuffers erreicht werden. In Tab. 2 ist der detaillierte Ablauf des Passagierens der Zellen dargestellt.

Tab. 2: Ablauf des Passagierens von Zellen.

Schritt	Lösung / Reagenz	Zeit
Lichtmikroskopische Kontrolle hinsichtlich Morphologie, Zelldichte und Kontaminationen		
Temperierung der benötigten Lösungen im 37° C-Wasserbad (A. Hartenstein, Würzburg, D)		20 min

Waschen	PBS ⁻	
Vorinkubieren im Zellkulturschrank*	PBS-EDTA 0,04 % (Carl Roth, Karlsruhe, D)	10 min
Lichtmikroskopische Kontrolle: Zellen abgekugelt? *		
Inkubieren mit Trypsin	0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung	3-5 min
Lichtmikroskopische Kontrolle: Zellen abgelöst?		
Abstoppen der Trypsinierung durch Zugabe von FCS-Lösung	DMEM + 10% FCS	
Resuspendieren der Zelllösung und Überführung in Zentrifugenröhrchen		
Abzentrifugieren der Zellen bei 1200 rpm		5 min
Überstand absaugen, Zell-Pellet in Medium resuspendieren		
Zellzählung mit Neubauer-Kammer (A. Hartenstein, Würzburg, D)	0,04% Trypanblau (Sigma-Aldrich)	
Aussäen der Zellen in neue Zellkulturflaschen in Zielkonzentration		

*bei humanen mvEZ notwendig

2.2.2 Kultivierung von humanen Speicheldrüsenepithelzellen in der Zellkulturflasche

Nach dem ersten Passagievorgang wurden die hSEZ in einer definierten Konzentration von 600 Zellen / cm² in eine 25 cm²-Kulturflasche ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % erfolgte das erneute Passagieren und das Ausbringen in gleicher Konzentration in eine 75 cm²-Kulturflasche (TPP Techno Plastic Products).

2.2.3 Kultivierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen in der Zellkulturflasche

Die mvEZ wurden mit einer Zieldichte von 1,2x10⁴ vitalen Zellen pro cm² ausgesät. Ab Passage 1 erfolgte der Wechsel von antibiotiahaltigem hin zu antibiotikafreiem Medium. Wurde eine zunehmende Teilbesiedelung mit Fibroblasten festgestellt, mussten diese

aus der Kulturflasche entfernt werden. Dazu wurde zunächst das VascuLife®-Medium abgesaugt und durch die gleiche Menge Versene-Lösung ersetzt. Die Fibroblasten begannen sich nach ca. 6-15 min Inkubationszeit im Zellkulturschrank abzukugeln und anschließend abzulösen. Die mvEZ waren zu diesem Zeitpunkt noch adhärent, sodass die Fibroblasten durch Entfernen von Versene und Waschen mit 5-10 ml PBS⁻ entfernt werden konnten.

2.2.4 Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Diese besteht aus 4 Großquadraten, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte durch eine Trypanblau-Färbung. Dies ist ein saurer Azofarbstoff, durch dessen Anion zytoplasmatische Proteine angefärbt werden.



Abb. 5: Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zellkammer.

Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Roter Pfeil: Nekrotische, blau angefärbte Zelle. Weißer Pfeil: Vitale, nicht angefärbte Zelle.

Wegen seiner Größe kann Trypanblau jedoch lediglich die permeabel gewordenen Membranen toter Zellen passieren. Somit stellen sich in der lichtmikroskopischen Kontrolle tote Zellen in einem deutlichen Blauton da, wodurch der Anteil vitaler, hell erscheinender Zellen festgestellt werden kann (Abb. 5). Um die Bestimmung der Zellzahl durchzuführen, wurde zur Zellsuspension im Verhältnis 1:2 0,4 %-Trypanblau gegeben. Von der Mischlösung wurden 10 μ l in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden ausgezählt und die Zahl vitaler Zellen in einem Milliliter der Zellsuspension nach

folgender Formel errechnet: $\text{Summe der Zellen aller 4 Quadrate} / 4 \times 10000 \times 2 = \text{Zellzahl/ml}$.

2.2.5 Fluorescein-Diacetat-Ethidiumbromid-Färbung

Zur Evaluation der Zellviabilität von adhärennten hSEZ wurde die Vitalfärbung mit Fluorescein-Diacetat(FDA)-Ethidiumbromid-Färbelösung in einer 24-Well-Platte durchgeführt. Ethidiumbromid dringt, ähnlich wie Trypanblau, in nekrotische Zellen ein, deren Membran nicht mehr intakt ist. Dadurch werden diese rot angefärbt. In vitalen Zellen wird FDA enzymatisch zu einem grün fluoreszierenden Farbstoff metabolisiert. Die mikroskopische Detektion des Fluoreszenzsignals von FDA erfolgte mit einem blauen Filter der Wellenlänge von 450-490 nm, für das Signal von Ethidiumbromid wurde ein grüner Filter der Wellenlänge von 520-560 nm verwendet. Die Aufnahmen aus der Lebend- und Totfärbung wurden in einem „Overlay“ miteinander kombiniert, wodurch eine gute Aussage zur Zellviabilität getroffen werden konnte (Abb. 6).

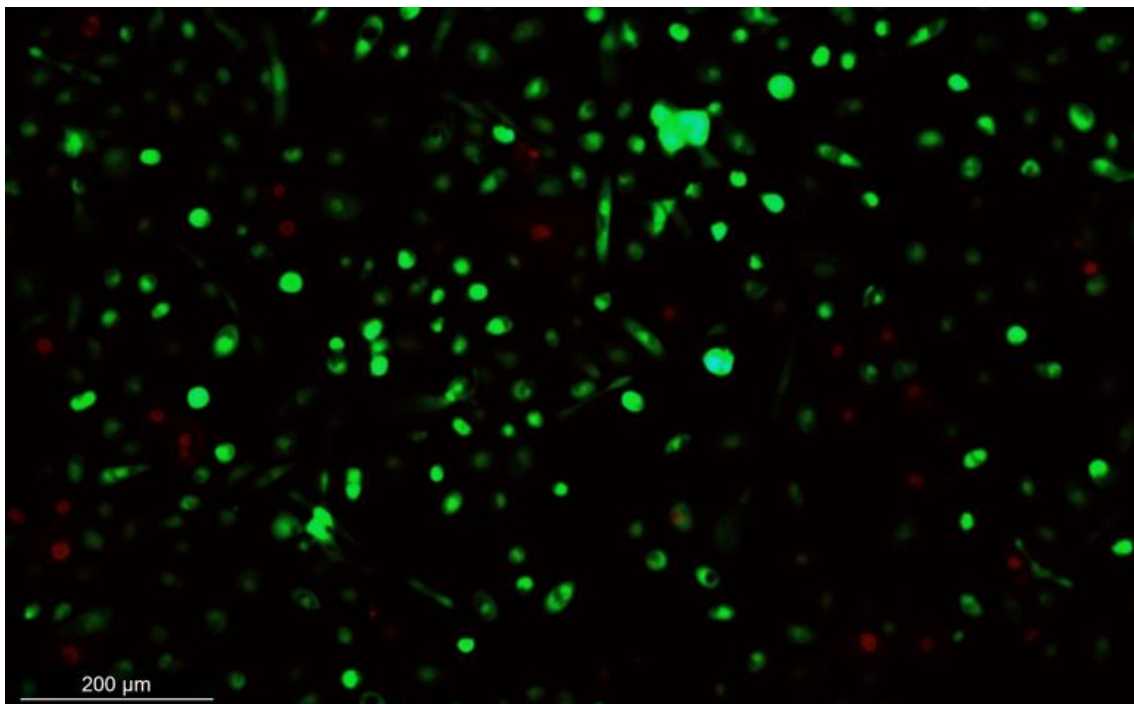


Abb. 6: hSEZ in der FDA-Ethidiumbromid-Färbung.

In der FDA-Ethidiumbromid-Färbung erscheinen die vitalen Zellen grün fluoreszierend, rot fluoreszierende Zellen sind nekrotisch.

2.3 Herstellung der Matrix SIS-muc

Die im folgenden Kapitel ausgeführte Gewinnung des porzinen Materials und dessen Dezellularisierung [69] sowie die Herstellung der SIS-muc [70] wurden durch den Lehrstuhl TERM durchgeführt. Das Prozedere entsprach dem durch diesen publizierten Standardverfahren.

2.3.1 Gewinnung des porzinen Jejunums

Landrasseschweine im Alter von ca. 6 Wochen wurden im Großtier-OP des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) des Universitätsklinikums Würzburg zunächst mit Ketamin und Azaperon anästhesiert und anschließend unter Einsatz des Tötungsmittels T 61 euthanasiert. Nach Eröffnung des Abdominalraums wurde das Jejunum inklusive des versorgenden arteriovenösen Gefäßbaums freipräpariert und dem Situs entnommen. Nach Entnahme erfolgte die Lagerung in PBS + 1 % Gentamycin bei 4° C [69]. Alle Tiere wurden gemäß des Leitfadens für die Pflege und Verwendung von Labortieren des NIH versorgt (National Institutes of Health, NIH, publication No. 85-23, 1996). Da es sich um Organentnahmen handelte, war hierfür kein Tierversuchsantrag notwendig. Die Operationen erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (§4 Absatz 3), die zuständige Behörde wurde in regelmäßigen Abständen durch den verantwortlichen Tierschutzbeauftragten informiert.

2.3.2 Ablauf der Dezellularisierung

Unter Dezellularisierung versteht man das Entfernen jeglicher Zellen aus einem Organ oder Gewebe, sodass am Ende des Prozesses lediglich das Bindegewebs-Gerüst verbleibt. Die Dezellularisierung des porzinen Jejunums erfolgt in einem viertägigen Prozess. Dieser umfasst die Säuberung des Darms und seiner anhängenden Gefäße mit antibiotisch versetztem Waschlösungspuffer, die eigentliche Dezellularisierung, den Abbau der zellulären DNA durch DNAsen und schließlich die Sterilisation durch γ -Bestrahlung mit 25 kGy.

Am ersten Tag der Dezellularisierung wurde zunächst eine Spülung der Matrix in einer Plastikwanne mit PBS + 1 % PenStrep vorgenommen. Dieses wurde sowohl über den arteriellen Schenkel mit einer Braunüle in das Gefäßsystem eingebracht, als auch direkt

in das Lumen des Darms, bis alle makroskopischen Kotreste entfernt waren. Nachfolgend wurde das Lumen mit PBS⁻ befüllt, an den Enden abgeklemmt und über Nacht in PBS⁻ bei 4° C auf einem Wippschüttler (neoLab, Heidelberg, D) gelagert.

Zu Beginn des zweiten Tages wurde der Spülpuffer aus dem Lumen des Darms entfernt und durch frisches, antibiotikafreies PBS⁻ ersetzt. Um das Gefäßsystem von allen Zellen zu befreien, wurde dessen arterieller Schenkel wiederum mit einer Braunüle (B.Braun) kanüliert und mit insgesamt 2 l Dezellularisierungslösung mit einem Druck von 80-100 mmHg mit Hilfe eines Pumpsystems gespült (Abb. 7). Vor Beginn des Dezellularisierungsprozesses wurden hierzu 4-6 l Dezellularisierungs-Lösung unter dem Abzug angesetzt, wobei jeweils 45 g Natriumdesoxycholat (Sigma, D6750-25G) in 2 l Reinstwasser gelöst wurden. Um die Dezellularisierungs-Lösung zu entfernen, wurde das Gefäßsystem darauffolgend mit 2 l PBS⁻ durchspült. Die Dezellularisierung des Darmgewebes selbst erfolgte, indem nun das Lumen komplett mit Dezellularisierungs-Lösung gefüllt wurde und der Darm in einem Gefäß, das ebenfalls mit dieser gefüllt war, über Nacht auf einem Wippschüttler bei 4° C inkubiert wurde.

Am dritten Tag wurde nach wiederholter Spülung des Gefäßsystems und Lumens mit PBS⁻ mit der Schere der Gefäßbaum abgetrennt und die Matrix in 6-8 cm lange Stücke geschnitten. Um die Serosa mit der Pinzette abziehen zu können, wurden diese Stücke danach auf 15 ml Zentrifugenröhrchen gespannt. Anschließend wurden die so präparierten Stücke nochmals dreimal für jeweils ca. 1 h in antibiotikahaltigem PBS⁻ bei 4° C auf dem Wippschüttler inkubiert. Über Nacht erfolgte schließlich die Inkubation mit DNase-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Am vierten Tag erfolgte die Entfernung der DNase-Lösung und die Lagerung in PBS⁻ + 1 % PensStrep bis zum Tag der Gamma-Sterilisation, wobei die Lösung am ersten Tag dreimal, an den Folgetagen jeweils einmal gewechselt wurde. Kurz vor Transport zur Sterilisation erfolgte die Überführung in antibiotikafreies PBS⁻. Die Sterilisation durch γ -Bestrahlung mit 25 kGy über Nacht wurde bei der Firma BBF Sterilisationservice GmbH in Rommelshausen durchgeführt.

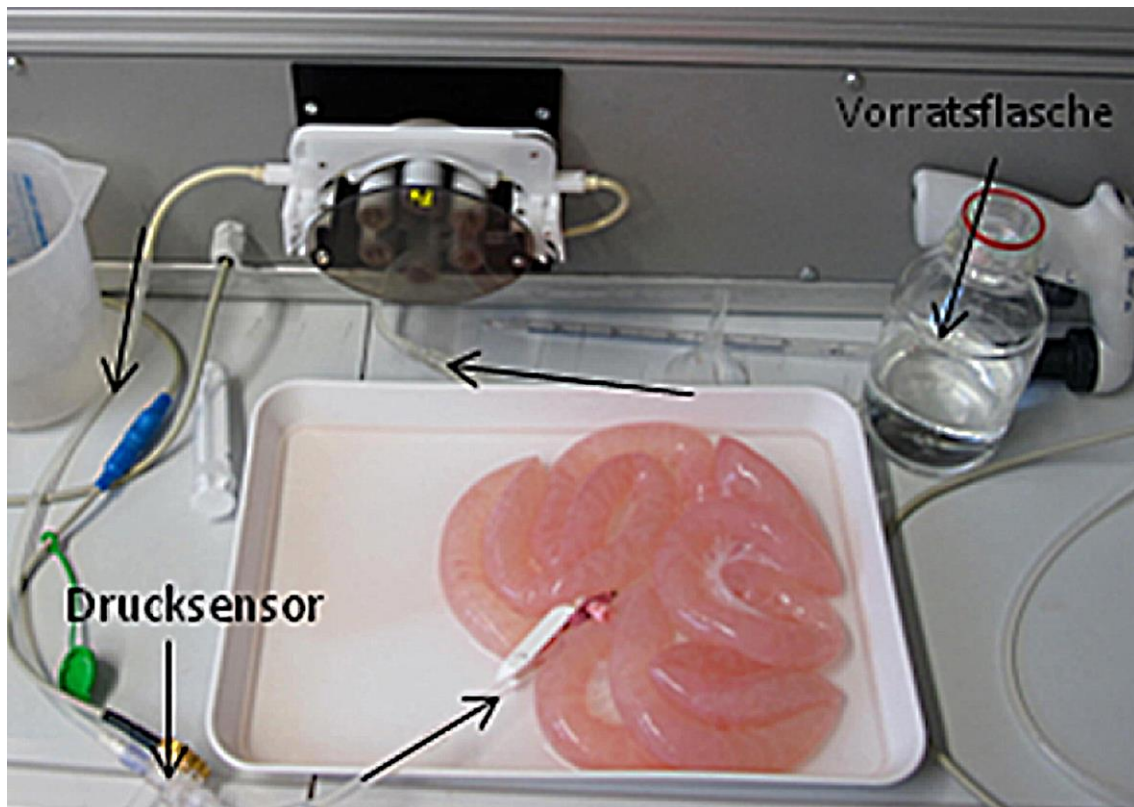


Abb. 7: Aufbau des Dezellularisierungskreislaufs.

Diese Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Corinna Rosenbaum (Lehrstuhl TERM, Universitätsklinikum Würzburg).

2.5 3D-Kultur auf der SIS-muc

2.5.1 Aufbau der Zellkronen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkronen (Lehrstuhl TERM) sind komplett aus Metall gefertigt. Sie bestehen aus einem Innen- und einem Außenring, zwischen denen sich die SIS-muc einspannen lässt (vgl. Kap. 2.5.2). Vier Abstandhalter am Boden der Zellkrone gewährleisten, dass die Unterseite der eingespannten Matrix ausreichend von Zellkulturmedium umspült wird. Der Aufbau einer Zellkrone wie sie für diese Arbeit verwendet wurde ist dem Schema in Abb. 8 zu entnehmen, in dem die verschiedenen Arbeitsschritte zum Aufbau der 3D-Kultur skizziert werden.

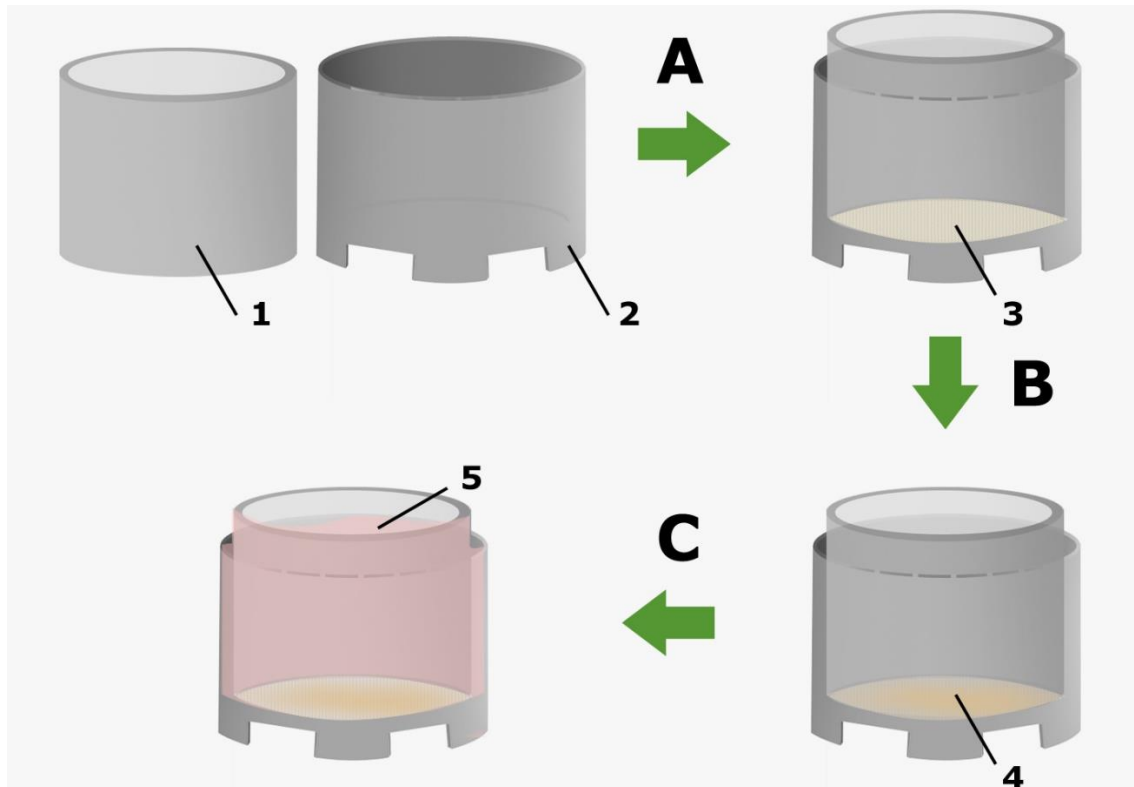


Abb. 8: Schematischer Aufbau einer Zellkrone.

Dargestellt sind der Innenring (1) und Außenring (2), die nach Einspannen der SIS-muc (3) auf den Innenring (A) zur vollständigen Krone zusammengesetzt werden. Als nächster Schritt folgt die Ausbringung (B) der hSEZ (4) und schließlich das Auffüllen der Krone (C) mit Medium (5). Das Schema bezieht sich beispielhaft auf die Besiedlung in 3D-Monokultur.

2.5.2 Einspannen und Vorbehandeln der SIS-muc

Um die Speicheldrüsenepithelzellen in einer 3D-Umgebung kultivieren zu können, musste die SIS-muc zunächst auf sogenannte Zellkronen gespannt werden, die am Vortag autoklaviert worden waren. Die SIS-muc-Stücke wurden zunächst in eine Petrischale überführt. Zu Beginn musste überprüft werden, ob die Außenseite der SIS-muc die serosale Seite repräsentierte, indem mit der Pinzette die fadenförmigen, bindegewebigen Residuen der serosalen Gefäße dargestellt wurden. Bei korrekter Konfiguration erfolgte die Eröffnung der Matrix durch einen Längsschnitt. Die eröffnete SIS-muc konnte nun plan auf dem Boden der Petrischale ausgebreitet und auf makroskopisch sichtbare Beschädigungen der Wandstruktur überprüft werden. Aus strukturell intakten Abschnitten der ausgebreiteten Matrix wurden ca. 1,5 cm² große

Stücke ausgeschnitten und so auf den Innenring der Kronen gezogen, dass die mukosale Seite zum Boden der Petrischale gewendet war (Abb. 9, B-F). Nach Entfernen von überstehendem Matrixmaterial am Kronen-Außenrand konnte das Außenstück der Krone auf das Innenstück gesetzt werden. Die Krone lag nun mit dem Unterteil nach oben gewendet (Abb. 9, H). Zellkronen, die für die Kokultur mit mvEZ verwendet wurden, konnten in dieser Orientierung in eine Zwölf-Well-Platte (TPP Techno Plastic Products) platziert werden. Die Zellkronen für die Monokultur mit hSEZ hingegen mussten vorher umgedreht werden, sodass die mukosale Seite der Matrix nach oben gewendet war. Alle Zellkronen wurden daraufhin zunächst für 24 h mit DMEM+10 % FCS im Zellkulturschrank vorinkubiert.

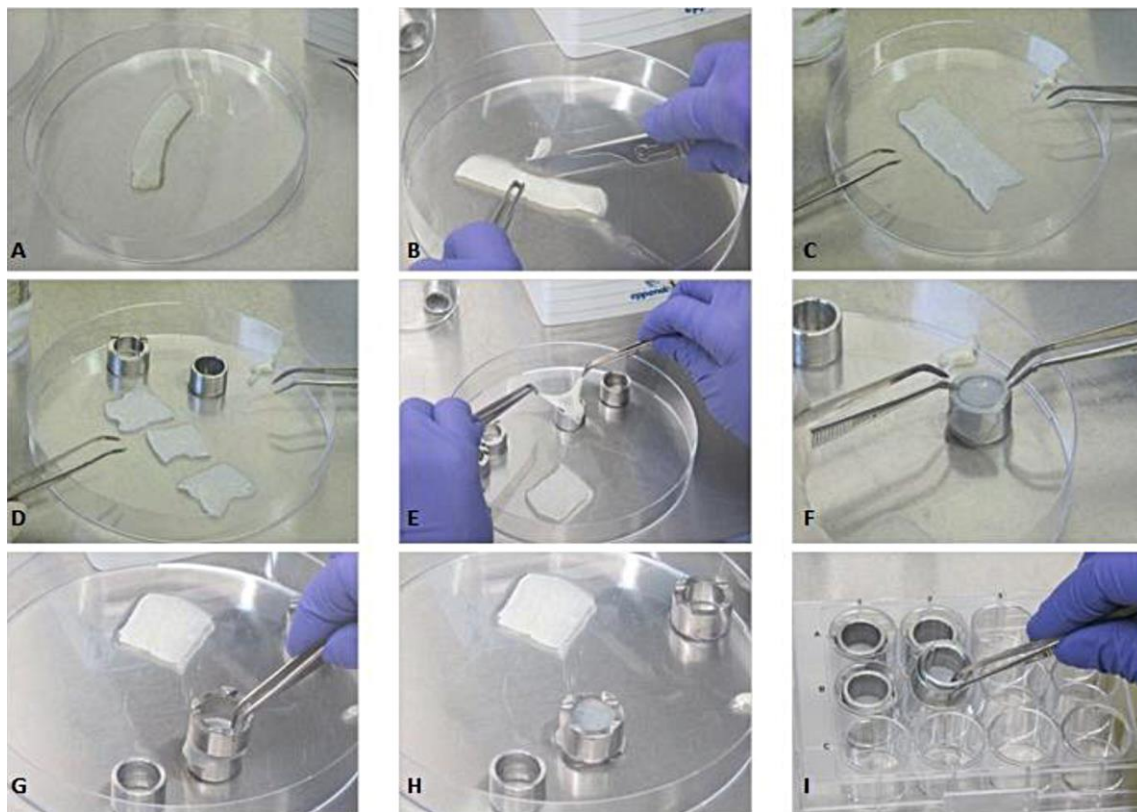


Abb. 9: Übersicht der Arbeitsschritte zum Einspannen der SIS-muc in Zellkronen.

A: Stück der SIS-muc. B: Längsseitiges Aufschneiden. C: Aufgeklappte SIS-muc, die luminal Seite liegt oben. D: Zerteilte SIS-muc. E-F: Überziehen der Matrix auf den Innenring der Zellkrone. G-H: Fixierung durch Aufsetzen des Außenrings der Zellkrone. I: Einsetzen in 12-Well-Platte. *Diese Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Sarah Nietzer (Lehrstuhl TERM, Universitätsklinikum Würzburg).*

2.5.3 Aussäen der mikrovaskulären Endothelzellen

Nachdem die bespannten Zellkronen 24 h mit DMEM + 10 % FCS im Zellkulturschrank inkubiert worden waren, erfolgte zunächst die Besiedelung der entsprechend orientierten Zellkronen mit mvEZ. Dazu wurden die Zellen zunächst nach dem in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Procedere abgelöst, die Zellzahl auf $0,4 \times 10^6$ Zellen / 50 μ l VascuLife®-Medium eingestellt und die Zellviabilität überprüft. Nach Absaugen des DMEM + 10 % FCS aus den Wells wurden daraufhin pro Zellkrone 50 μ l der Zellsuspension langsam auf die serosale Seite der SIS-muc pipettiert, sodass so wenig Suspension wie möglich auf den Außenring der Krone gelangte. Nach 90 Minuten wurden weitere 50 μ l VascuLife®-Medium pro Krone nachpipettiert, um einem Austrocknen der Matrix vorzubeugen. Nach insgesamt 3 h konnten die Wells mit VascuLife®-Medium aufgefüllt werden, sodass die serosale Matrixseite komplett von Medium bedeckt war. Die mvEZ wurden für 2 Tage im Zellkulturschrank inkubiert.

2.5.4 Aussäen der humanen Speicheldrüsenepithelzellen

Die Besiedelung der SIS-muc erfolgte am Tag nach dem Einspannen in die Zellkronen, wobei ausschließlich Zellen der Passage 2 und 3 verwendet wurden. Nach Aspiration des Mediums aus den Zellkulturflaschen wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst. Die Zellzahl wurde auf $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 50 μ l AECM eingestellt und die Zellviabilität überprüft. Zuletzt wurde das Medium aus dem Inneren der Zellkronen und dem umgebenden Well abgesaugt und die Zellen konnten in der definierten Konzentration auf die SIS-muc ausgesät werden. Die Wellplatte wurde in den Kulturschrank überführt und nach einer Inkubationszeit von 3 h mit AECM befüllt, indem in das Kroneninnere 500 μ l und in das umgebende Well 1 ml pipettiert wurde. Hierzu wurde bei der Kokultur mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen ein 1:1 Mediums-Gemisch von VascuLife®-Medium und AECM verwendet, bei der Monokultur hingegen ausschließlich AECM.

2.5.5 Kultivierung humaner Speicheldrüsenepithelzellen in Mono- und Kokultur mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen auf der SIS-muc

Der Mediumswechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Um das Wachstumsverhalten der hSEZ im gleichen Zeitraum und unter gleichen Bedingungen in 2D- und 3D-Kultur vergleichen zu

können, wurden diese mit der identischen Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen in eine 75 cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät. Bei einer Konfluenz von 90 % wurden sie in eine 150 cm^2 -Zellkulturflasche (TPP Techno Plastic Products) passagiert. Die Versuche wurden nach 7 und 14 Tagen gestoppt.

2.6 Histologie

2.6.1 Fixierung von Gewebe und Zellen auf der SIS-muc

Nach Entfernen der besiedelten SIS-muc aus dem Innenring der Metallkrone wurde diese mit einem Skalpell in Viertel geteilt. Für die Kryo- und Paraffineinbettung wurde jeweils eines dieser Viertel für eine Stunde in 4%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (AppliChem, Darmstadt, D) fixiert.

2.6.2 Herstellung der Kryoschnitte

Nach Fixierung wurde die Probe entnommen, mit der Pinzette flach auf dem Boden eines Einbett-Behälters (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) platziert und zuletzt mit TissueTec (Sakura Finetek Europe B.V.) bedeckt. Der Behälter wurde für 45 min auf Trockeneis gestellt, bis der Inhalt vollständig gefroren war und anschließend bei -80°C gelagert. Die Gewebeschnitte wurden in einer Dicke von $10 \mu\text{m}$ geschnitten und auf SuperFrost+-Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen, D) gezogen.

2.6.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Einbettung wurde mit einem Paraffin-Einbettautomaten (Mikrom STP120, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D) durchgeführt. Die dabei durchlaufenen Schritte sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Paraffineinbettung der SIS-muc.

Schritt	Lösung / Reagenz	Zeit (h)
Auswaschen des Fixans	VE-Wasser	1
Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung	Ethanol 50%	1
	Ethanol 70%	1
	Ethanol 80%	1
	Ethanol 96%	1

	Isopropanol I	1
	Isopropanol II	1
	(Carl Roth)	
Entfernung des Alkohols	Isopropanol/Xylol (1:2)	1
	Xylol I	1
	Xylol II	1
Paraffinierung des Gewebes	Paraffin I	1,5
	Paraffin II	1,5
	(Sigma Aldrich, München, D)	

Nach abgeschlossener Einbettung konnten die SIS-muc-Stücke aus den Einbettkassetten entfernt werden. An einer Paraffin-Ausgießstation (Leica Microsystems, Wetzlar, D) erfolgte nun die weitere Verarbeitung.

Zunächst wurde der Boden einer dafür vorgesehen Metallform (Labonord, Mönchengladbach, D) mit heißem Flüssigparaffin (Carl Roth) bedeckt. In dieses wurde mit einer Pinzette jeweils ein Stück der eingebetteten SIS-muc gestellt. Die Pinzette konnte entfernt werden, sobald das Stück durch das am Boden der Form angehärtete Paraffin aufrecht zum Stehen kam. Dies wurde dadurch erreicht, dass die Metallform nach Einbringen der Matrix in das enthaltene Flüssigparaffin auf einer Kühlfläche platziert wurde, sodass eine vom Boden ausgehende und somit das SIS-muc-Stück stabilisierende Aushärtung induziert wurde. Anschließend konnte der Boden der Einbettkassette auf die Metallform platziert werden und diese vollständig mit Paraffin befüllt werden. Die Aushärtung der Blöcke war nach etwa 2 Stunden abgeschlossen, sodass die Metallform vom Block entfernt werden konnte. Die Lagerung der Blöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

Vor Beginn des Schneidens mussten die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte (Leica Microsystems) gekühlt werden, da sie hierdurch eine für den Schneidprozess geeignetere, härtere Konsistenz als bei Raumtemperatur annehmen. Nach ca. 30 min Kühlzeit erfolgte dann das Einspannen jeweils eines Blocks in den Führungsschlitten des Mikrotoms (Leica Microsystems). Zunächst wurde eine große Schnittdicke (ca. 30 µm)

eingestellt, um die Oberfläche des Blocks einheitlich anzuschneiden. Dann wurde die Dicke auf 7 µm umgestellt. Durch eine so geringe Schnittdicke wird gewährleistet, dass die gefärbten Schnitte später mikroskopisch gut beurteilbar sind und Überlagerungen verschiedener Zell- oder Gewebeschichte vermieden werden. Die Schnitte wurden unmittelbar nach dem Abtragen vom Block in ein auf 50° C temperiertes Streckbad (Medax, Kiel, D) überführt, in dem sie geglättet wurden. Anschließend wurden die Schnitte auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Langenbrinck) aufgezogen. Zuletzt erfolgte die Trocknung in einem auf 37° C temperierten Trockenschrank (Memmert, Schwabach, D). Die anschließende Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.6.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt eine Übersichtsfärbung dar, die eine gute, zügige Beurteilbarkeit verschiedenster Zell- und Gewebestrukturen gewährleistet. Hierbei werden das Zytoplasma, also die Zellkörper der Zellen rot und die Zellkerne blau gefärbt [71].

Der standardisierte Prozess der Entparaffinierung und Rehydrierung ist im Folgenden in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Entparaffinierung der Schnitte vor der Färbung.

Schritt	Lösung / Reagenz	Zeit
Erwärmen des Paraffins im Wärmeschrank bei 37°C		Über Nacht
Entparaffinierung	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
Absteigende Reihe zur Rehydrierung	Ethanol 96% I	3x auf- und abtauchen
	Ethanol 96% II	3x auf- und abtauchen
	Ethanol 70%	3x auf- und abtauchen
	Ethanol 50%	3x auf- und abtauchen
	VE-Wasser	

Bei Kryoschnitten musste zunächst das TissueTec-Fixans entfernt werden. Hierzu wurden diese für ca. 30 min auf dem Wippschüttler in eine mit VE-Wasser gefüllte Glasküvette (Mercateo, München, D) gestellt.

Nach entsprechender Vorbereitung wurden sowohl die Kryo- als auch die Paraffinschnitte nach der im Labor etablierten Standardmethode, die in Tab. 5 aufgeführt ist, gefärbt.

Tab. 5: Ablauf der Hämytoxylin-Eosin-Färbung.

Schritt	Lösung / Reagenz	Zeit
Färbung der sauren Zellbestandteile	Hämalaun (Carl Roth)	8 min
Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs	VE-Wasser	
Differenzierung des Farbstoffs im sauren Milieu	HCl-Ethanol (VWR, Darmstadt, D)	2x kurz eintauchen
Spülen	VE-Wasser	1x eintauchen
Bläuen	Leitungswasser	5 min
Färbung der basischen Bestandteile	Eosin (Sigma-Aldrich)	1 min
Spülen	VE-Wasser	
Dehydrierung, Differenzierung des Eosin-Farbstoffs	Ethanol 70%	2x kurz eintauchen
	Ethanol 96%	
	2-Propanol I	2 min
	2-Propanol II	5 min
Entfernen des Ethanols	Xylol I	5 min
	Xylol II	5 min
Eindecken der Objektträger	Entellan (Merck, Darmstadt, D)	

2.7 Immunfluoreszenz

2.7.1 Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung

Bei der Immunfluoreszenz-Färbung werden Antikörper verwendet, um Antigene zu markieren, indem sie spezifisch an diesen binden. Zur Detektion wird ein Sekundärantikörper verwendet, der wiederum an ein Fluorophor gekoppelt ist. Er bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers und bewirkt somit ein fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Signal [72].

2.7.2 Antigen-Aufbereitung

Die durch Kryofixierung gewonnen Gewebeschnitte wurden nach Entnahme aus der Lagerung bei -20°C zunächst in VE-Wasser gewaschen, um Reste des TissueTec-Fixans zu entfernen. Bei den Paraffinschnitten wurde vor der Waschung mit VE-Wasser zunächst eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt. Nach diesen fixierungsspezifischen Vorbereitungsschritten wurden die Schnitte in einem Pufferbad mit Citratpuffer 10 min bei ca. 95°C inkubiert. Durch die zugeführte Hitze können molekulare Querverbindungen zwischen den Bindungsstellen für die Primärantikörper aufgebrochen werden, wodurch diese einen besseren Kontakt zu ihren spezifischen Bindungsstellen erhalten. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS-Puffer wurden die auf den Objektträgern befindlichen Schnitte mit einem Fettstift umkreist und in die so geschaffene Fläche pro Objektträger ca. 200 μl Blocking-Lösung (0.3 % Triton X, 5 % BSA, 5 % Donkey Serum) gegeben, sodass potentielle unspezifische Bindungsstellen für den Sekundärantikörper blockiert werden konnten. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wurde die Lösung durch seitliches Klopfen des Objektträgers auf Zellstoffpapier entfernt.

2.7.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Inkubation mit den 1:100 verdünnten Primärantikörpern dauerte 2 h und erfolgte bei Raumtemperatur. Die 1:400 verdünnten Sekundärantikörper inkubierten 30 min lang in einer lichtundurchlässigen Box, um das photosensible Fluorophor des Sekundärantikörpers vor Lichteinstrahlung zu schützen. Die Einbettung erfolgte mit Mowiol (Sigma-Aldrich) in dem für die Anfärbung der Kerne bereits 0,1 % DAPI

(SouthernBiotech, Birmingham, USA) enthalten waren. Die Objektträger wurden bei 4° C in lichtundurchlässigen Quatriperm-Schalen (Nalge Nunc International, New York, USA) gelagert.

2.8 α -Amylase-Assay

2.8.1 Prinzip des α -Amylase-Assay

Zur Messung der α -Amylase-Aktivität wurde ein Amylase Assay kit (Colormetric, ab102523, Abcam, Milton, GB) verwendet. Mit diesem lässt sich die Aktivität der menschlichen α -Amylase in einer zweistufigen Reaktion bestimmen. Im ersten Schritt spaltet die in der Probe vorhandene α -Amylase das Substrat Ethylden-pNP-G7. Die Produkte dieser Spaltung werden durch das enthaltene Enzym α -Glukosidase modifiziert. Dadurch wird ein Chromophor freigesetzt, das bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt wird (siehe Abb. 10).

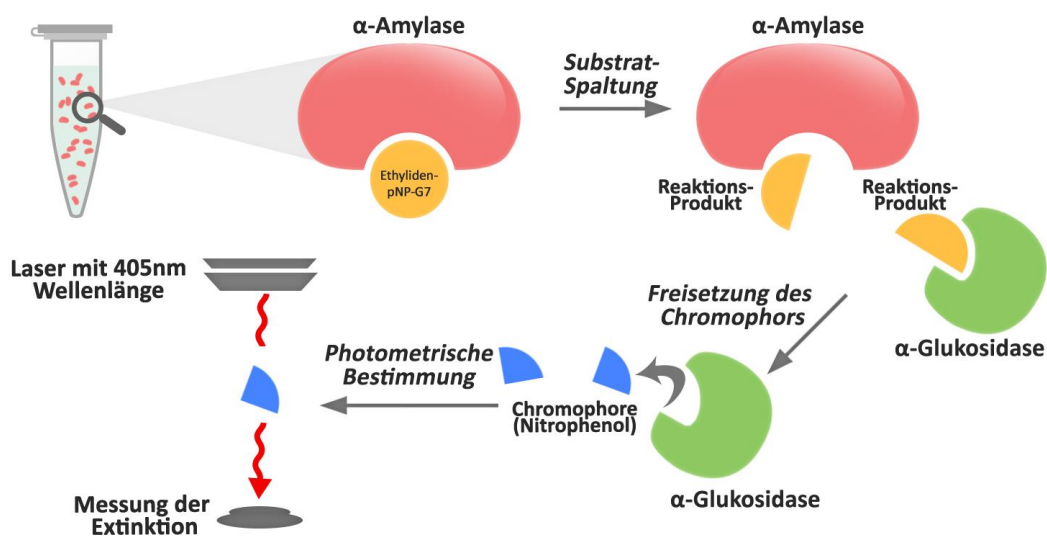


Abb. 10: Schematische Darstellung des Prinzips des α -Amylase-Assay.

2.8.2 Gewinnung der Proben

Zur Gewinnung der Proben aus der 3D-Kultur wurden beim Mediumswechsel 300 μ l des Überstands, der sich im Innenring der Krone über der Matrix befand, mit einer Pipette abgesaugt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. In der 2D-Kultur wurde das gesamte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und in Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die Lagerung bis zur Durchführung des Assays erfolgte bei -80° C.

2.8.3 Durchführung des α -Amylase-Assay

Bei der Durchführung des Assays wurden die Proben nach dem Auftauen zunächst bei 15000 rpm für 5 min bei 4° C zentrifugiert, um unlösliche Komponenten zu entfernen. Der Überstand wurde abgesaugt und auf Eis gelagert.

Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Standardkurve durch Erstellen einer Verdünnungsreihe nach dem in Tab. 6 skizzierten Pipettierschema:

Tab. 6: Pipettierschema zur Erstellung einer Standardkurve beim α -Amylase-Assay.

Standardnummer	Standardvolumen	Puffer	Endvolumen	α -Amylase/Well
1	0 μ l	150	50 μ l	0 nmol/Well
2	6 μ l	144	50 μ l	4 nmol/Well
3	12 μ l	138	50 μ l	8 nmol/Well
4	18 μ l	132	50 μ l	12 nmol/Well
5	24 μ l	126	50 μ l	16 nmol/Well
6	30 μ l	120	50 μ l	20 nmol/Well

Zunächst wurden die Proben auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde eine 96-Well-Platte mit den Proben für die Standardkurve, den Positivkontrollen und den gesammelten Proben aus den Überständen der SIS-muc befüllt. Das aufgebrachte Volumen betrug jeweils 50 μ l, wobei die Zusammensetzung der Positivkontrollen aus 5 μ l α -Amylase-Positivkontrolle und 45 μ l doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) bestand. Nachdem die Platte befüllt war, wurde nun der Reaktionsmix hinzu pipettiert, der aus 50 μ l Assay Puffer und 50 μ l Substratmix bestand. Jede zu analysierende Probe wurde in Duplikaten angelegt.

Nach dem Auftragen des Reaktionsmix wurde die Absorption bei einer optischen Dichte von 405 nm in einem 10-minütigen Zeitintervall für eine Zeitspanne von 120 Minuten gemessen. Um aus den gemessenen Absorptionswerten die α -Amylase-Enzymaktivität berechnen zu können, wurden zunächst die Mittelwerte der technischen Duplikate aller gemessenen Werte errechnet. Von diesen wurde dann die Absorption des „Standard 1“

(auch: „Blank“) subtrahiert. Das Ergebnis dieser Subtraktion waren die Werte für die korrigierte Absorption.

Schließlich wurden die Werte der Standardreihe gegeneinander aufgetragen, eine Trendlinie erzeugt und die entsprechende Gleichung errechnet. Die Trendlinie ist in Abb. 11 dargestellt.

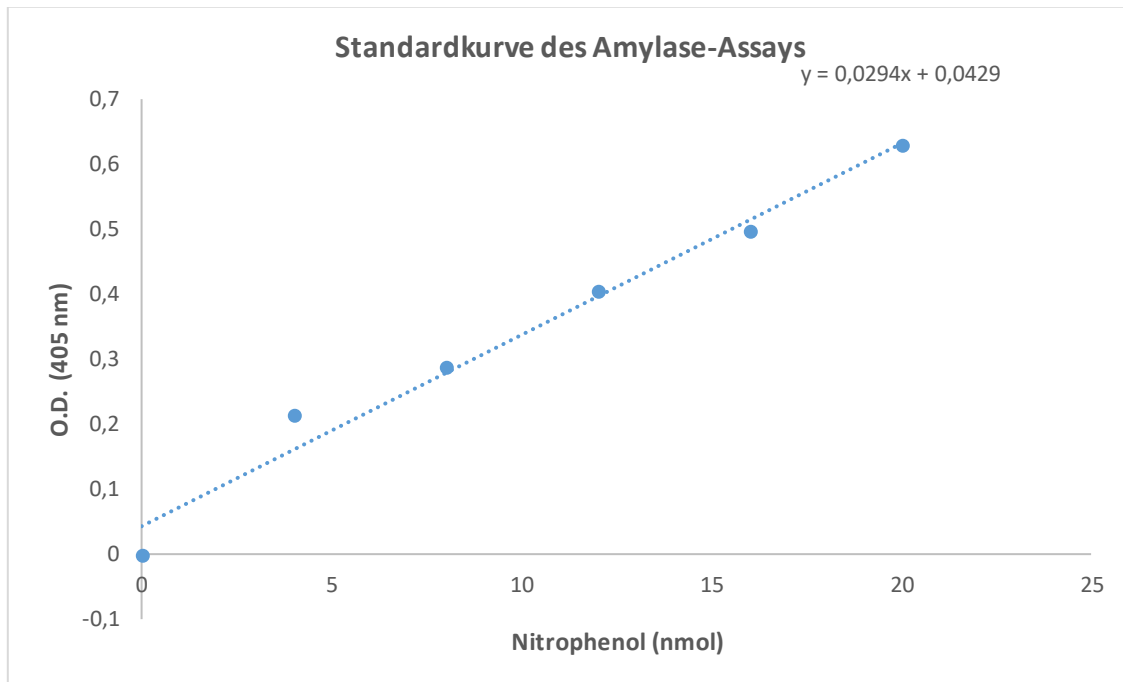


Abb. 11: Errechnete Standardkurve des α -Amylase-Assay.

Aufgetragen ist die gemessene Absorption bei 405 nm gegen die Nitrophenol-Konzentration, die im jeweiligen Well vorlag.

Nun erfolgte in verschiedenen Schritten die Berechnung der α -Amylase-Aktivität:

Zunächst wurden die gemessenen Werte gegen die Trendlinie extrapoliert:

$$B = \frac{\text{Korrigierte Absorption} - (Y - \text{Achsenabschnitt})}{\text{Steigung}}$$

Durch Einsetzen der Trendliniengleichung erhielt man:

$$B = \frac{\text{Korrigierte Absorption} - (0,0429)}{0,0294}$$

Nun wurden die nach der vergangenen Zeit $\Delta T=110$ min gemessenen Werte (A2) von den zu Beginn der Messreihe erfassten (A1) subtrahiert:

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

Zuletzt wurde wie folgt die α -Amylase-Aktivität berechnet:

$$\alpha - \text{Amylase} - \text{Aktivität} \left(\text{in } \frac{mU}{mL} \right) = \frac{\Delta A}{\Delta T \times V}$$

Dabei entsprach V dem Probenvolumen von 0,05 ml.

2.9 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

2.9.1 Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie werden Objekte in einem Hochvakuum mit einem Elektronenstrahl bestrahlt. Aus den Wechselwirkungen der Elektronen mit der Oberfläche des Objekts wird dann ein Bild berechnet, das digital ausgegeben wird. Das durch diese Methode erreichte Auflösungsvermögen beträgt bis zu 1.000.000:1 und erlaubt somit die Darstellung und Analyse von Strukturen, die mit den Methoden der Lichtmikroskopie (Auflösungsvermögen ca. 2000:1) nur sehr unzureichend oder gar nicht erfassbar sind.

2.9.2 Gewinnung und Präparation der Proben

Die Gewinnung und Fixierung der Proben sowie die rasterelektronenmikroskopische Analyse erfolgten durch den Autor dieser Arbeit. Die weitere Probenvorbereitung wurde nach Transport in das Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg durch die Mitarbeiter der AG von Herrn Prof. Dr. G. Krohne durchgeführt.

Nach Abstoppen des Versuchs an den definierten Zeitpunkten wurde ein Achtel der besiedelten SIS-muc für die Rasterelektronenmikroskopie asserviert, indem es in PBS gewaschen und anschließend über Nacht in 6,25 % Glutaraldehyd-Lösung (Merck) bei 4° C fixiert wurde. Nach der Fixierung wurden die Proben am Folgetag fünf Mal in Sörensenpuffer (AppliChem) gewaschen, um eine restlose Entfernung des Fixans zu gewährleisten. Danach konnten die Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe (Sigma-Aldrich) entwässert werden.

Nach Entwässerung der Proben erfolgte deren Trocknung durch sogenannte Kritischpunkttrocknung. Dieses Verfahren erlaubt eine besonders effektive Entfernung von Flüssigkeiten von Feststoffen.

Die Proben wurden nach Überführung in ein grobmaschiges Drahtsieb (Specimen baskets, BAL-TEC AG, Balzers, FL) in der mit 100 % Aceton gefüllten Probenkammer des Kritischpunkttrockners CPD 030 (BAL-TEC AG) platziert, die auf 4° C vorgekühlt war. Um das Aceton aus der Probe zu entfernen, wurde es unter einem Druck von 60 bar durch flüssiges CO₂ ausgetauscht. Dieser Vorgang wurde acht Mal wiederholt, um eine vollständige Entfernung des Acetons zu gewährleisten. Zuletzt wurde der Druck in der Kammer auf 74 bar erhöht und die Temperatur auf 31°C eingestellt, sodass das flüssige CO₂ in die Gasphase überging und über ein Ventil entweichen konnte. Die getrockneten Proben wurden mithilfe von Klebmasse auf Probenhaltern (Plano GmbH, Wetzlar, D) fixiert.

Um zu verhindern, dass Proben sich bei hohen Spannungen, die für ein gutes Auflösungsvermögen notwendig sind, elektrisch aufladen, können Sie mit einer dünnen, metallischen Schicht überzogen werden. Dies erfolgte bei den SIS-muc-Proben mit einer Gold-Palladium-Mischung (Verhältnis 80:20) im Sputter Coater SCD 005 (BAL-TEC AG). In diesem befindet sich eine Kammer, die mit Argon-Gas befüllt ist. Durch ein elektrisches Feld werden Argon-Ionen erzeugt und auf eine Gold/Palladium-Platte geschossen, sodass Atome zur Probe hin beschleunigt werden und auf dieser schließlich eine dünne Metallschicht bilden.

Die Lagerung der metallisierten Proben erfolgte in einem Exsikkator (Novus NS-Tubus, Duran Group GmbH Mainz). Die Mikroskopie und Analyse der Proben wurde in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg, in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Krohne, mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop des Typs JSM 7500F (Jeol GmbH, Freising, D) durchgeführt.

2.10 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse

2.10.1 Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht die detaillierte Darstellung kleinster Objekte bis hin zu einer Auflösung von 0,05 nm. Im Gegensatz zur Rasterelektronenmikroskopie werden die Objekte hierbei nicht nur bestrahlt, sondern vom Elektronenstrahl durchdrungen. So wird die Darstellung zellulärer Ultrastrukturen wie Vesikel, Mitochondrien oder Zell-Zell-Verbindungen möglich.

2.10.2 Gewinnung und Präparation der Proben

Wie bei der rasterelektronenmikroskopischen Analyse erfolgten Gewinnung und Fixierung der Proben sowie die Mikroskopie durch den Autor dieser Arbeit, wohingegen die weitere Probenvorbereitung durch Mitarbeiter der AG von Herrn Prof. Dr. G. Krohne, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg, durchgeführt wurde.

Wie bei der Rasterelektronenmikroskopie wurde auch für die TEM-Analyse nach Abstoppen des Versuchs ein Achtel der besiedelten SIS-muc in PBS gewaschen und anschließend für 45 min in 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung bei 4° C fixiert. Die weiteren Arbeitsschritte der Präparation sind Tab. 7 zu entnehmen:

Tab. 7: Fixierung der Proben für die TEM-Analyse.

Schritt	Lösung / Reagenz	Zeit
Fixieren	2,5 % Glutaraldehyd (Merck)	45 min
Waschen	50 mM Cacodylatpuffer pH 7,2 (Carl Roth)	5x 3 min
Kontrastieren	2% OsO ₄ Osmiumtetroxid (Science Services, München, D)	90-120 min
Waschen	H ₂ O	5x 3 min
Kontrastieren	0,5 % Uranylacetat (Merck)	über Nacht
Waschen	H ₂ O	5x 3 min
Entwässern	30 % Ethanol bei 4° C	30 min
	50 % Ethanol bei 4° C	30 min

	70 % Ethanol bei 4° C	30 min
	90 % Ethanol bei 4° C	30 min
	96 % Ethanol bei 4° C	30 min
	100 % Ethanol bei 4° C	3x 30 min
	Propylenoxid bei Raumtemperatur	3x 30 min
Einbetten	1:1-Gemisch aus Propylenoxid (Sigma-Aldrich) und Epon (Serca, Eppelheim, D)	Über Nacht
Einbetten	Epon	2x 2 h
Transport in Einbettform		
Einbetten	Epon	1 h
Polymerisation bei 60° C		48 h

Die eingebetteten, ausgehärteten Kristalle wurden im Mikrotom (EM UC7, Leica) eingespannt und ca. 60 nm dick geschnitten.

Die Betrachtung und Fotodokumentation der Proben erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop des Typs JEM 2100 (Jeol) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg.

2.11. RNA-Isolation

2.11.1 Prinzip der RNA-Isolation

Die RNA dient unter anderem der Transkription genetischer Information innerhalb der Zelle. Die Analyse der RNA gibt somit Aufschluss über die Expression bestimmter Genabschnitte. Hierzu muss die RNA zunächst von allen anderen Zellbestandteilen getrennt werden und isoliert werden (siehe Abb. 12). Dies erfolgte in dieser Arbeit durch Verwendung von Standardkits, die durch spezielle Zentrifugations-Säulen (Spin Columns) und standardisierte Reagenzien eine zuverlässige, effektive Isolation gewährleisten.

2.11.2 Durchführung der RNA-Isolation von besiedelter SIS-muc

Sämtliche Schritte der RNA-Isolation wurden unter einem Abzug durchgeführt. Es wurde stets darauf geachtet, die Kontamination der Materialien und Proben mit RNasen zu vermeiden. Dies sind extrem beständige Enzyme, die RNA zerstören. Die Arbeitsflächen und der Pipettenabwurf wurden daher vor Arbeitsbeginn mit RNase Exitus Plus (AppliChem) gereinigt und die verwendeten Stahlkugeln in einem Becherglas gebacken.

Zur RNA-Isolation von in 3D-Kultur besiedelter SIS-muc wurde die SIS-muc nach 14 Tagen Zellkulturdauer zunächst von der Zellkrone entfernt und in PBS⁻ gewaschen. Der besiedelte Teil der Matrix wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und aufgeteilt. Der für die RNA-Isolation bestimmte Anteil wurde in ein Reaktionsgefäß mit 350 µl RLT-Puffer, der zuvor mit 10 µl β-Mercaptoethanol / ml (Carl Roth) versetzt worden war, überführt, auf Trockeneis gefroren und bis zur Isolation bei -80° C gelagert.

Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des RNeasy Micro Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany). Zunächst mussten die asservierten SIS-muc-Teilstücke homogenisiert werden. Hierzu wurde je eine Probe in ein 2ml-Reaktionsgefäß zusammen mit einer steril gebackenen Stahlkugel und 350 µl RLT-Puffer (Quiagen) überführt (Abb. 12). Das Reaktionsgefäß wurde im Tissue Lyser platziert und für 3-5 min bei 50 Hz geschüttelt.

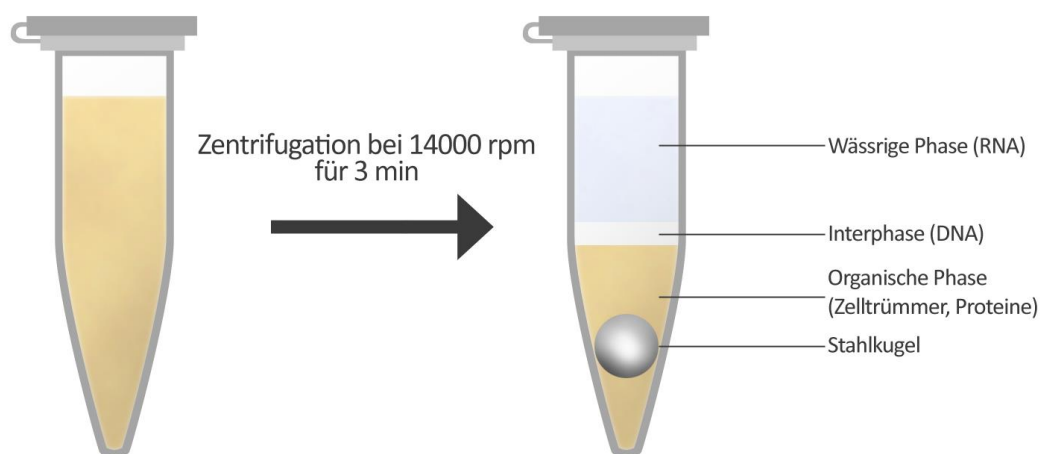


Abb. 12: Schematische Darstellung der Phasenauffrennung bei RNA-Isolation.

Danach wurde der Homogenisierungsgrad überprüft und der Schüttelvorgang bei Vorhandensein makroskopisch sichtbarer Gewebestücke wiederholt. Nach ausreichender Lysierung des Gewebes wurde das Reaktionsgefäß für 3 min bei 14000

rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit diesem Lysat erfolgten die weiteren Arbeitsschritte, die in Tab. 8 zusammengefasst sind. Die RNA bleibt im Verlauf der Arbeitsschritte an der Silikatmembran der RNeasy MinElute spin column (Quiagen) haften und wird erst am Ende durch Zentrifugation von RNase-freiem Wasser über die Säule herausgewaschen.

Tab. 8: Ablauf der RNA-Isolation von besiedelter SIS-muc.

Arbeitsschritt	Lösung / Reagenz	Zeit
Hinzugeben zur abpipetierten RNA-Phase	1 Volumen 70 % Ethanol	
Überführen in RNeasy MinElute spin column (Quiagen)		
Zentrifugieren der Spin column bei 10000 rpm		1 min
Collection tube verwerfen, Spin column in neues Collection tube platzieren		
In Spin column pipettieren	500 µl RPE Puffer (Quiagen)	
Zentrifugieren der Spin column bei 10000 rpm		1 min
Überstand im Collection tube verwerfen		
Spin column wieder auf das gleiche Collection tube zurückstecken		
In Spin column pipettieren	500 µl 80% Ethanol	
Zentrifugieren der Spin column bei 10000 rpm		2 min
Collection tube verwerfen, Spin column in neues Collection tube platzieren		
Deckel der Spin column öffnen		
Zentrifugieren der geöffneten Spin column für 5 min bei 15000 rpm		5 min

Collection tube verwerfen, Spin column in 1,5 ml-Reaktionsgefäß stecken		
In Spin column pipettieren, Deckel der Spin column schließen	20 µl RNase-freies Wasser	
Zentrifugieren der Spin column bei 15000 rpm		2 min

Das Eluat befand sich am Ende des letzten Zentrifugierungsvorgangs im 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Dieses wurde bis zur RNA-Messung auf Eis gelagert.

2.11.3 Durchführung der RNA-Isolation von humanem Parotisgewebe

Zur Überprüfung der Primer und der Bestimmung der optimalen Annealing-Temperaturen wurde RNA aus Präparaten nativer, humaner Ohrspeicheldrüse gewonnen. Die Präparate wurden zunächst dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und danach mit einem sterilen Skalpell in ca. 0,5 cm³ große Stücke portioniert. Nach Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml RNA-Later-Lösung (Ambion, Austin, TX, USA) erfolgte die Lagerung bei -80° C. Danach erfolgte die RNA-Isolation analog zum Protokoll, das bei der besiedelten SIS-muc angewendet wurde.

2.11.4 Durchführung der RNA-Isolation von primären, humanen Speicheldrüsenepithelzellen

Die hSEZ wurden wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben aus OP-Präparaten isoliert und über 3 Passagen kultiviert. Bei jeder Passage wurden ca. 5×10^5 Zellen gezählt, abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer (Quiagen) überführt und durch 1-minütiges Vortexen homogenisiert. Das Lysat wurde in ein Qiashredder spin column (Quiagen) überführt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde 1 Volumen 70 %iger Ethanol zu dem Lysat hinzugegeben, welches sich nun in dem 2 ml Collection Tube befand. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat gemischt, anschließend in eine Rneasy MinElute spin Column gegeben und 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Collection Tube wurde samt Inhalt verworfen. Auf die Membran des Rneasy MinElute spin column wurde 350 µl RW1-Puffer (Quiagen) gegeben, für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert und das Collection Tube samt Inhalt wieder verworfen. Es erfolgte die Mischung von 10 µl DNase I Stock-

Lösung (Roche) und 70 µl RDD-Puffer (Quiagen) her. Das Gemisch (Gesamtmenge: 80 µl) wurde auf die Membran der Rneasy MinElute spin column gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden zusätzlich 350 µl RW1-Puffer hinzupipettiert, das Gemisch wurde für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Inhalt der Collection Tube wurde verworfen. 500 µl 80%iger Ethanol wurden auf die Membran des Rneasy MinElute spin column pipettiert und 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Rneasy MinElute spin column wurde in ein neues 2 ml Collection Tube gestellt, der Deckel wurde geöffnet und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt der Collection Tube verworfen. Zum Herauslösen der RNA aus der Membran der Rneasy MinElute spin Column wurden 20 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (15000 rpm) zentrifugiert. Die in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangene RNA konnte bis zur weiteren Bearbeitung bei -20° C gelagert werden.

2.11.5 Messung der RNA

Um die isolierte RNA weiterverarbeiten zu können, wurde sie zunächst mit dem Infinite M200 Mikroplattenleser (Tecan, Crailsheim, D) quantifiziert. Zunächst wurden die Messpunkte der zugehörigen NanoQuant-Platte kalibriert, indem 2 µl RNase-freies Wasser auf diese aufgetragen und eine Standard-Messung durchgeführt wurde. Nach Entfernung des RNase-freien Wassers wurden die Messpunkte mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gereinigt und jeweils 2 µl der RNA-Lösung aufgetragen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software iconcontrol (Tecan).

2.12 cDNA-Synthese

2.12.1 Prinzip der cDNA-Synthese

Da für die Polymerasekettenreaktion (PCR) DNA benötigt wird, musste die isolierte RNA zunächst in sogenannte complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte durch die Verwendung von Oligo-dT-Primern, die sich zunächst an die RNA anlagern und so den Ausgangspunkt für die Reverse Transkriptase bilden. Dies ist ein Enzym, das einen komplementären Strang zur einsträngigen RNA synthetisieren kann, sodass cDNA daraus entsteht [73].

2.12.2 Durchführung der cDNA-Synthese

Die zur cDNA-Synthese benötigten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut und sämtliche Pipettier-Schritte auf Eis durchgeführt. Die Synthese erfolgte mit dem iScript cDNA Synthese Kit (Biorad Laboratories, München, D).

Zunächst wurde die gewonnene RNA so verdünnt, dass maximal 1 µg RNA in 15 µl RNase-freiem Wasser enthalten waren. Zu jeder dieser Proben wurden jeweils ein Mastermix aus 4 µl „iScript Reaction mix“ und 1 µl „iScript reverse Transcriptase“ hinzugegeben, sodass sich ein Endvolumen von 20 µl ergab. Die Proben wurden in den Thermocycler (Biorad Laboratories) überführt, der mit dem in Tab. 9 enthaltenden Arbeitsprotokoll gestartet wurde. Nach der Synthese im Thermocycler wurde die cDNA abzentrifugiert und bei -20° C gelagert.

Tab. 9: Arbeitsprotokoll des Thermocyclers bei der cDNA-Synthese.

Schritt	Temperatur	Zeit
RNA-Denaturierung	25° C	5 min
cDNA-Synthese	42° C	30 min
Denaturierung der Reversen Transkriptasen → Abbruch der cDNA-Synthese	85° C	5 min
4° C	4° C	∞

2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.13.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein gentechnisches Verfahren, das es erlaubt, spezifische Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu vervielfältigen. Hierfür werden thermostabile DNA-Polymerasen verwendet, deren Temperaturoptimum bei ca. 72° C liegt [74]. Außerdem werden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) benötigt, die das Substrat der DNA-Polymerase sind und somit das Ausgangsmaterial für die Polymerisierung neuer Komplementärstränge darstellen. In sogenannten Thermocyclern werden Zyklen mit einer Abfolge verschiedener, definierter Temperaturstufen wiederholt. Bei jedem dieser Zyklen wird die gewünschte Ziel-DNA

vervielfältigt, sodass in der Regel nach ca. 30 Zyklen ein exponentieller Anstieg der DNA-Menge erfolgt. Ein Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten - den ersten stellt die Denaturierung dar. Hier lösen sich bei 95° C die Wasserstoffbrückenbindungen, die die Basenpaare der DNA miteinander verbinden. Der Doppelstrang wird aufgebrochen. Am Ende des Denaturierungsschrittes liegen sowohl die Ziel-DNA als auch die Primer als Einzelstränge vor. Im zweiten Schritt kommt es zur Primer-Anlagerung („Annealing“). Um eine Anlagerung der spezifischen Primer an die komplementären Abschnitte der Ziel-DNA zu gewährleisten, wird die Temperatur abgesenkt. Die genaue Annealing-Temperatur hängt dabei von der Länge der verwendeten Primer ab. Die angelagerten Primer bilden den Startpunkt („Promotor“) für die DNA-Polymerase, die im letzten Schritt, der Elongation, den Komplementärstrang an den durch die Primer markierten Stellen der DNA synthetisiert. Hierzu lagert sich die DNA-Polymerase dem 3'-Ende des Primers an und beginnt damit, komplementäre Nukleotide an den Einzelstrang anzufügen.

2.13.2 Gradienten-Polymerasekettenreaktion

Um die ausgewählten Primer auf ihre Funktion hin zu überprüfen und ihre optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt, wofür cDNA aus humanem Speicheldrüsengewebe verwendet wurde. Als Positivkontrolle wurde cDNA des Housekeeping-Gens EF1 α , als Negativkontrolle Wasser verwendet, die Konzentration der Primer wurde durch 1:20-Verdünnung mit Wasser auf 100 pmol/ μ l eingestellt. Als Housekeeping-Gene werden Gene bezeichnet, die konstitutiv exprimiert werden, um basale Zellfunktionen aufrecht zu erhalten. Aufgrund dessen werden sie in Genexpressionsanalysen als Referenzgröße verwendet. Die hier verwendeten Primer sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: Liste der für die Gradienten-PCR verwendeten Primer mit Sequenzen.

	α -Amylase	Zytokeratin 18	EF1 α
Sequenz Forward Primer	GAGGGGTTTCAGGTC TCTCCA	GAZCATCGAGGACCT GAGGG	GACCTGCCGTCTAGAAAA CC

Sequenz Reverse Primer	TGTTCTGCACTCAC AGCAT	GGCCTTTTACTTCCTC TTCGTGG	GCTGTAGCCAAATTCGTTG TC
Länge des Produkts	221 bp	278 bp	235bp

Das Probenvolumen von 1 µl cDNA bei den Gewebe- und Positivproben bzw. 1 µl Wasser bei den Negativproben wurde mit jeweils 29 µl Mastermix (Bioline, Luckenwalde, D) versetzt, dessen genaue Zusammensetzung in Tab. 11 aufgeschlüsselt wird. Anschließend wurden die Proben in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Thermocycler Sensoquest bei Annealing-Temperaturen zwischen 51° C und 61° C inkubiert.

Tab. 11: Gradienten-PCR Mastermix.

Bestandteil	Menge
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
H ₂ O	18,7 µl
5x Mango-Taq-Puffer (Ladepuffer für Gelelektrophorese)	6 µl
MgCl ₂ 50 mM	1 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
Taq-Polymerase Bioline (5000 U/ml)	0,3 µl

2.13.3 Gelelektrophorese

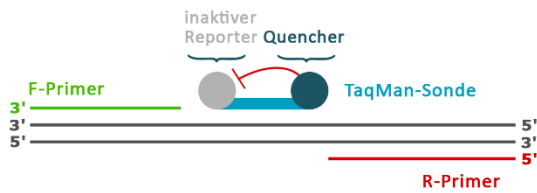
Die Gelelektrophorese ist ein analytisches Verfahren, das auf Basis der negativen Ladung der Nukleinsäuren die Auftrennung bestimmter Genprodukte nach deren Länge ermöglicht. Dazu werden die jeweiligen Proben in präformierten Lücken eines Polymer-Gels platziert. Durch Anlegen elektrischer Spannung wird bewirkt, dass sich die negativ geladene DNA in Richtung der Anode bewegt, wobei sich die Geschwindigkeit dieser Bewegung antiproportional zur Länge des untersuchten Genprodukts verhält. Im vorliegenden Versuch kam für die Auftrennung der DNA ein Agarosegel zum Einsatz. Dieses wurde angesetzt, indem 3,2 g 2%-Agarosepulver (Biozym Scientific, Oldendorf,

D) in 160 ml TAE-Puffer (Tris-Acetat-Puffer, Sigma-Aldrich) gelöst und für 3 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle (Panasonic, Hamburg, D) erhitzt wurde, bis keine Schlierenbildung mehr sichtbar war. Nach Hinzufügen von 12,8 µl Ethidiumbromid-Färbelösung (A. Hartenstein) wurde das Gel unverzüglich in einen entsprechenden Schlitten gegossen. Nach einer Latenzzeit von 30 min, in der sich das Gel abkühlte und verfestigte, wurden die wie in Tab. 11 aufgeführt mit Mango-Taq-Ladepuffer versetzten Proben (10 µl) in die mit einem Gelkamm erzeugten Geltaschen pipettiert. Bei ca. 200 V Spannung und 180 mA Stromstärke erfolgte der Auftrennungsprozess über einen Zeitraum von etwa 100 min. Die Bandendetektion erfolgte über einen UV-Transilluminator. In Kapitel 3.5 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese aufgeführt.

2.13.4 Prinzip der real-time quantitativen Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Im Unterschied zur konventionellen PCR ist mit der RT-qPCR eine fluoreszenzbasierte DNA-Quantifizierung möglich. Dies kann -wie in dieser Arbeit durchgeführt- durch eine TaqMan-Sonde erfolgen, ein Oligonukleotid, welches zwischen F- und R-Primern an eine Zielsequenz bindet. Sie trägt an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden „Reporter“-Farbstoff, an ihrem 3'-Ende einen „Quencher“-Farbstoff. Diese Sonde lagert sich in der „Annealing“-Phase (Abb. 13, 1) zunächst wie die Primer am Matrizenstrang an. In diesem Zustand wird bei Anregung der Sonde das Fluoreszenz-Signal des Reporters durch die direkte Nähe zum Quencher unterdrückt. Während der Elongationsphase (Abb. 13, 2) wird die Sonde jedoch durch die aktivierte TaqPolymerase vom Strang verdrängt und schließlich gespalten, sodass Reporter und Quencher getrennt werden. Nun kann das Signal des Reporters detektiert werden und ist äquivalent zur Akkumulation des PCR-Produkts, da nur die spezifische Amplifikation der durch die Primer definierten Genabschnitte zur Spaltung der Sonde führt. Die Fluoreszenzmessungen finden an definierbaren Punkten der RT-qPCR statt.

1. Annealing-Phase



2. Elongations-Phase

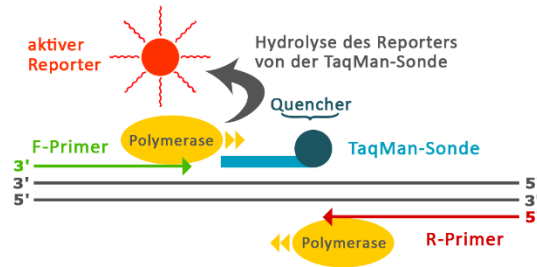


Abb. 13: Schematische Funktionsweise der TaqMan-Sonde bei der RT-qPCR.

Zur quantitativen Analyse der vervielfältigten DNA wurde softwaregestützt der CT-Wert bestimmt, der beschreibt, wann die Fluoreszenz des Zielgens die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

2.13.5 Durchführung der real-time quantitativen Polymerasekettenreaktion

Zu Beginn wurden alle für die Durchführung benötigten Reagenzien aufgetaut und auf Eis gestellt. Alle verwendeten Lösungen wurden zu Beginn mit dem Vortexer homogenisiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Für die vergleichende Analyse wurde die cDNA von hSEZ aus der 2D-Kultur sowie aus 3D-Mono- und Kokultur verwendet. Es erfolgte die quantitative Auswertung von α -Amylase und Zytokeratin 18, als Kontrollgene wurden GAPDH und EF1 α verwendet. Die genaue Auflistung der für die RT-qPCR verwendeten Primer findet sich in Tab. 12.

Tab. 12: Liste der für die RT-qPCR verwendeten Primer mit Sequenzen.

	α -Amylase	Zytokeratin 18	EF1 α	GADPH
Sequenz Forward Primer	GAGGGGTTC AGGTCTCTCC A	GAZCATCGAGG ACCTGAGGG	GACCTGCCGTCT AGAAAAACC	AGGTGATTATCCT GAACCATCC
Sequenz Reverse Primer	TGTTCTGCA CTCACAGCAT	GGCCTTTTACTT CCTCTTCGTGG	GCTGTAGCCAAA TTCGTTGTC	AAAGGTGGATAG TCTGAGAAGC
Länge des Produkts	221 bp	278 bp	235bp	229bp


Zunächst wurde die cDNA 1:10 und die Primer 1:25 mit ddH₂O verdünnt. Dann wurde für jede Einzelprobe in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß ein Reaktionsmix hergestellt, dessen Zusammensetzung sich in Tab. 13 findet.

Tab. 13: RT-qPCR-Reaktionsmix.

Reaktionskomponente	Menge
TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher) <ul style="list-style-type: none"> • AmpliTaq Gold® DNA Polymerase • Uracil-N Glykosylase (UNG) • dNTPs/dUTP • ROX™ Passiv-Referenz • Pufferkomponenten 	10 µl
Reverse Primer	2 µl
Forward Primer	2 µl
cDNA (Positiv) / H ₂ O (Negativkontrolle)	2 µl
H ₂ O	7 µl

Die probenspezifischen Reaktionsmischungen wurden nach einem zuvor erstellten Plattenbelegungsschema in eine 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert, wobei von allen Proben Duplikate angelegt wurden. Zuletzt wurde die Abdichtungsfolie auf die 96-Well-Zellkulturplatte (TPP Techno Plastic Products) geklebt und diese im CFX96-Thermocycler (Biorad Laboratories) platziert. Dieser wurde mit dem in Tab. 14 und Abb. 14 skizzierten Protokoll gestartet. Die Expression von α -Amylase wurde gegen die von Zytokeratin 18 normalisiert, die relative Expression wurde definiert als die über die 3 biologischen Replikate gemittelte, x-fache Änderung der Genexpression gegenüber der 2D-Kultur.

Tab. 14: Einzelschritte der PCR.

Schritt-Nummer	Temperatur	Zeit in s	Schritt
1	95°C	180	Aktivierung der DNA-Polymerase
2  x40	95°C	10	Denaturierung der DNA
3	61°C/72°C	60	Annealing und Elongation

4	95°C	10	Denaturierung
5	65°C	5	Abkühlung

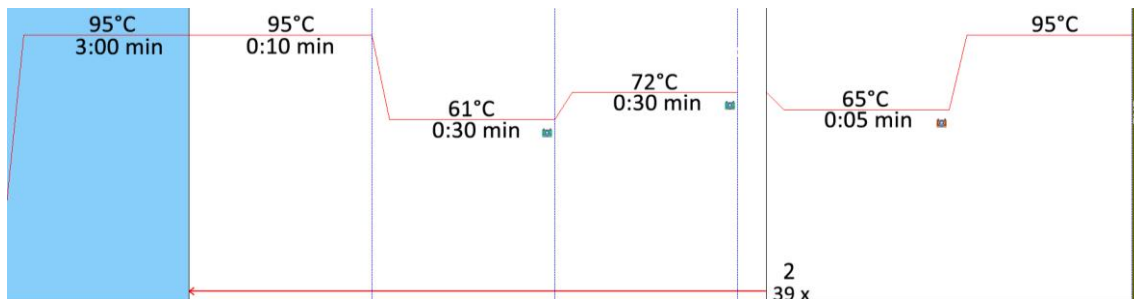


Abb. 14: Laufprotokoll für die Durchführung der RT-qPCR.

In Schritt 1 erfolgt die Aktivierung der verwendeten DNA-Polymerase. Die Schritte 2 (Denaturierung der doppelsträngigen DNA) und 3 (Anlagerung der Stränge und Elongation) wurden 40-mal wiederholt.

2.13.6 Primer-Effizienzbestimmung

Zur Validierung der Ergebnisse der RT-qPCR ist es wichtig, die Effizienz der verwendeten Primer zu bestimmen. Dazu wurde zunächst die PCR-Produkte aus der vorangegangenen RT-qPCR mit Hilfe des „Wizard SV Gel Clean-Up System“-Kits aufgereinigt. Anschließend wurde mit den aufgereinigten Produkten die in Tab. 15 dargestellte Verdünnungsreihe erstellt. Für die Verdünnungen mit allen zuvor verwendeten Primern wurde dann eine weitere RT-qPCR durchgeführt.

Tab. 15: Verdünnungsreihe zur Ermittlung der Primer-Effizienz.

Verdünnungsstufe	cDNA-Menge (aus der jeweils vorherigen Verdünnungsstufe)	Hinzugefügtes ddH ₂ O
10 ⁻¹	5 µl	45 µl
10 ⁻²	10 µl	90 µl
10 ⁻³	10 µl	90 µl
10 ⁻⁴	10 µl	90 µl
10 ⁻⁵	10 µl	90 µl
10 ⁻⁶	10 µl	90 µl

10^{-7}	10 μ l	90 μ l
10^{-8}	10 μ l	90 μ l
10^{-9}	10 μ l	90 μ l
10^{-10}	10 μ l	90 μ l

Aus den Cq-Werten dieser Verdünnungsreihen konnte mit der zugehörigen Software eine Standardkurve erstellt werden. Durch Analyse der Steigung m dieser Standardkurve konnte die Effizienz der jeweiligen Primer berechnet werden. Die entsprechenden Ergebnisse finden sich in Kapitel 3.5.

2.14 Statistische Verfahren

Alle Versuche wurden mit hSEZ von drei unterschiedlichen Spendern ($n=3$) wiederholt. Dies erfolgte unter Verwendung technischer Duplikate. Die statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert und -falls vorliegend- innerhalb der jeweiligen Abbildungen mit einem Stern gekennzeichnet (*). Zur Durchführung der statistischen Analyse wurde die Software SigmaPlot 12.5 verwendet. Zum Einsatz kamen der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test sowie der Post-Hoc Dunn's Test. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von nativem Speicheldrüsengewebe

Um die Gewebestruktur darzustellen, erfolgten HE-Färbungen von nativen Gewebeschnitten, in denen sich der typische Aufbau mit Azini, Ausführungsgängen und Blutgefäßen darstellte (Abb. 15). Zur funktionellen Charakterisierung der Speicheldrüse und für den Vergleich mit hSEZ in 2D- und 3D-Kultur wurden verschiedene gewebe- bzw. zelltypspezifische Marker verwendet. Es erfolgten Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Aquaporin-5 (AQP-5), Claudin-1 (CL-1) und α -Amylase, jeweils zusammen mit Panzytokeratin. Aquaporine sind Kanal-Proteine, durch die Wasser eine Zellmembran passieren kann.

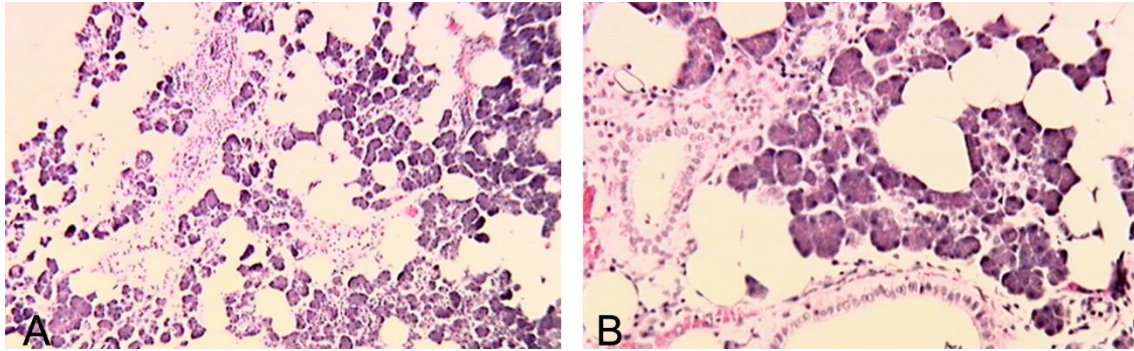


Abb. 15: HE-Färbung eines Nativpräparats der humanen Ohrspeicheldrüse.

Der Subtyp AQP-5 ist in der Speicheldrüse daran beteiligt, hypotonen Speichel zu produzieren (Lee et al., 1996). Claudine sind Bestandteile sogenannter Schlussleistenkomplexe, die eine Abdichtung von Interzellularräumen und damit den Aufbau von Zellbarrieren ermöglichen. Sie finden sich in der Speicheldrüse vor allem in den Ausführungsgängen [75]. α -Amylase ist eines der wichtigsten Verdauungsenzyme, das im menschlichen Speichel enthalten ist. Auf seine genauen Funktionen wurde in 1.1 bereits eingegangen. Zytokeratine sind Bestandteile aller Epithelzellen und stabilisieren in den Azinuszellen der Speicheldrüse die Zellstruktur [76]. Im Nativgewebe waren alle Ziel-Marker in typischer Verteilung ausgeprägt (siehe Abb. 16).

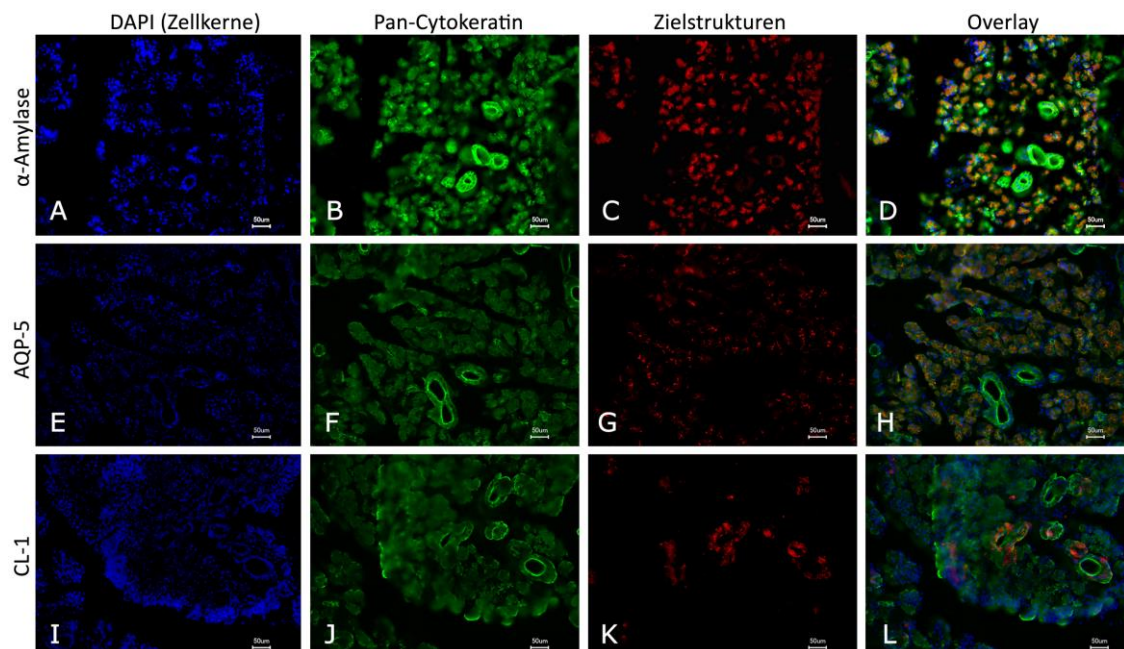


Abb. 16: Immunfluoreszenzaufnahmen eines Nativpräparats der humanen Ohrspeicheldrüse.

Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (Bilder A, E, I), die Zellkörper mit Panzytokeratin (Bilder B, F, J). Die jeweiligen Zielstrukturen erscheinen rot. Die Abbildungen A-D zeigen die Färbung gegen α -Amylase (rot), die innerhalb der Azini lokalisiert ist. In E-H kommt AQP-5 (rot) in den Zellmembranen der azinären Zellen zur Darstellung. Die Bilder I-L zeigen CL-1 (rot), das vor allem an den Zellen der Ausführungsgänge zu sehen ist.

3.2 Kultivierung von Zellen in 2D-Kultur

3.2.1 Kultivierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen

Die morphologische Charakterisierung der verwendeten Zellen erfolgte durch Phasenkontrast-Aufnahmen. Nachdem die MOKs, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, ca. 14 Tage kultiviert wurden, begannen die hSEZ aus diesen auszusprossen und eine subkonfluente Kultur zu bilden (Abb. 17, A-C).

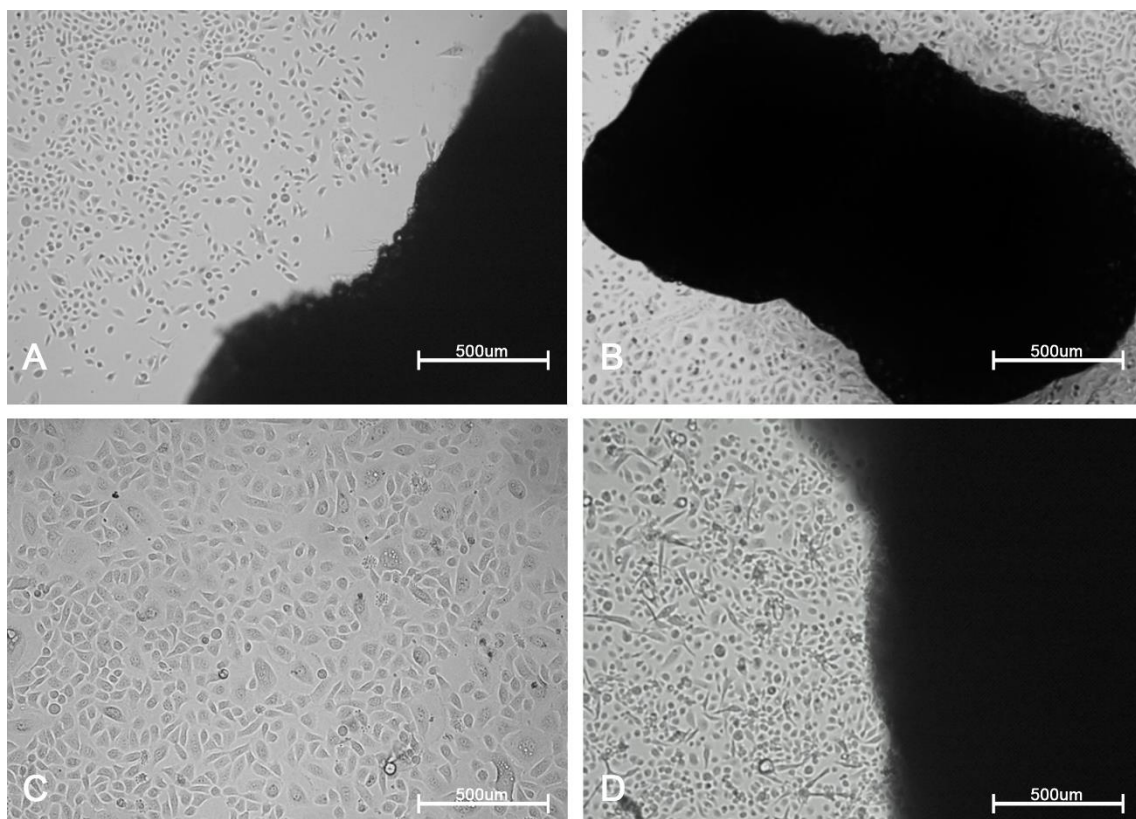


Abb. 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von hSEZ.

Abbildung A zeigt die vom MOK aussprossenden Zellen in subkonfluenter Kultur. Abbildung B und C zeigen eine ca. 80%ige Konfluenz, 21 Tage nach Beginn der Zellkultur. Auf Abbildung D ist exemplarisch eine Kultur mit hohem Fibroblastenanteil dargestellt, diese sind an den länglichen Zellkörpern zu erkennen. Die mit der Trypanblau-Methode überprüfte Zellvitalität lag stets bei

über 85%. Bei einem zu hohen Fibroblastenanteil (>30 %) wurden die betroffenen Wells verworfen.

3.2.2 Kultivierung der mikrovaskulären Endothelzellen

Die Isolation der mvEZ aus humanen Hautbiopsaten erfolgte wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Danach wurden die Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät (siehe 2.2.3). Nach einigen Tagen der Zellkultur entstanden kleine Zell-Cluster aus adhärennten Zellen (Abb. 18, A und C). Die verwendeten mvEZ können ihre typischen Eigenschaften nur einige Passagen lang aufrechterhalten, bevor die Dedifferenzierung einsetzt. Daher wurden nur mvEZ bis Passage 3 zur Kokultur mit hSEZ verwendet.

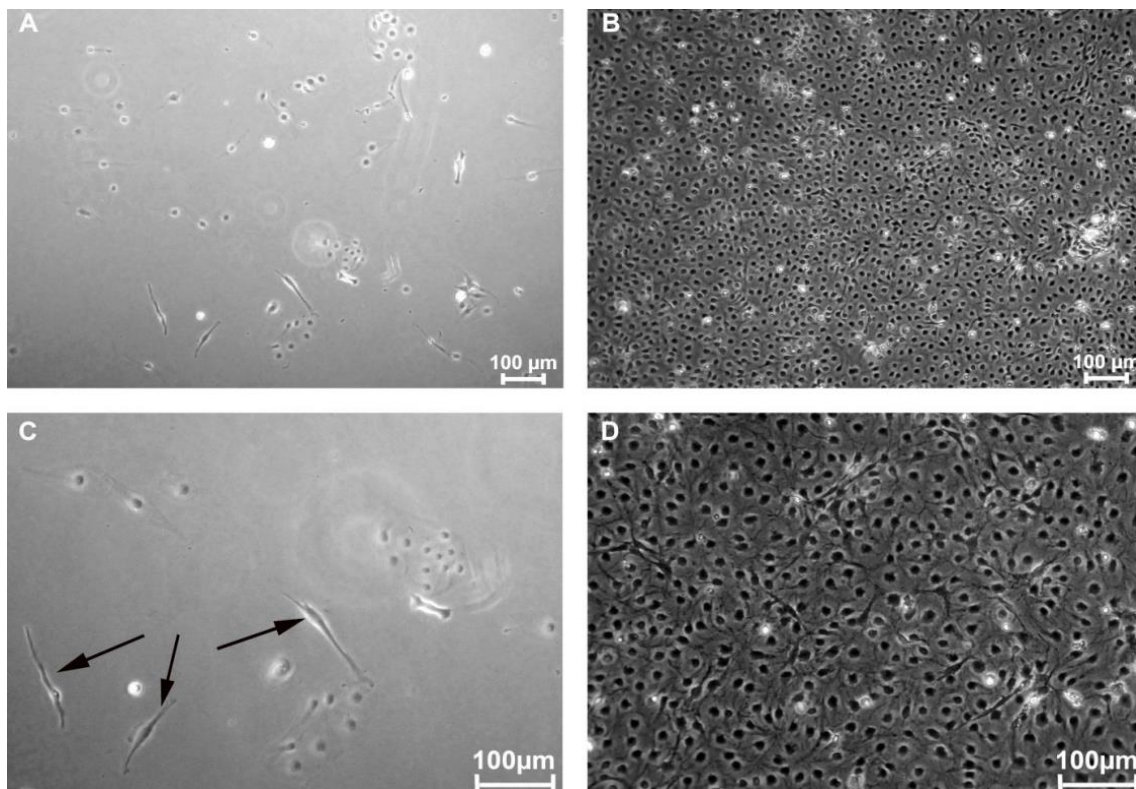


Abb. 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mvEZ.

Auf den Bildern A und C sind Zellen der Passage 0 mit einer Kulturdauer von 3 Tagen nach Isolation dargestellt. Die Endothelzellen bilden kleine Zellcluster. In Bild C sind Fibroblasten zu erkennen (Pfeile), die eine Kontamination der mvEZ-Kultur darstellen. Die Abbildungen B und D zeigen mvEZ der Passage 1, 11 Tage nach der Isolation.

Diese Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Corinna Rosenbaum (Lehrstuhl TERM, Universitätsklinikum Würzburg).

3.3 Charakterisierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen in 2D-Kultur

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunfluoreszenzgestützten Charakterisierung der in 2D-Kultur kultivierten hSEZ ausgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse des α -Amylase-Enzymaktivitätstests und der RT-qPCR-Analyse der α -Amylase-Genexpression werden in Kapitel 3.4.4 erläutert.

Um die Ausprägung der zelltypspezifischen Zielmarker AQP-5, α -Amylase und CL-1 vergleichend analysieren zu können, erfolgte die 2D-Kultur von hSEZ über 3 Passagen wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Zwischen den Zell-Passagen 1-3 blieb der Prozentsatz der α -Amylase-produzierenden Zellen relativ konstant, zwischen den Einzelexperimenten traten jedoch diesbezüglich große Schwankungen von 6,2-100% auf. Eine Anfärbung für AQP-5 konnte in der 2D-Kultur nicht nachgewiesen werden.

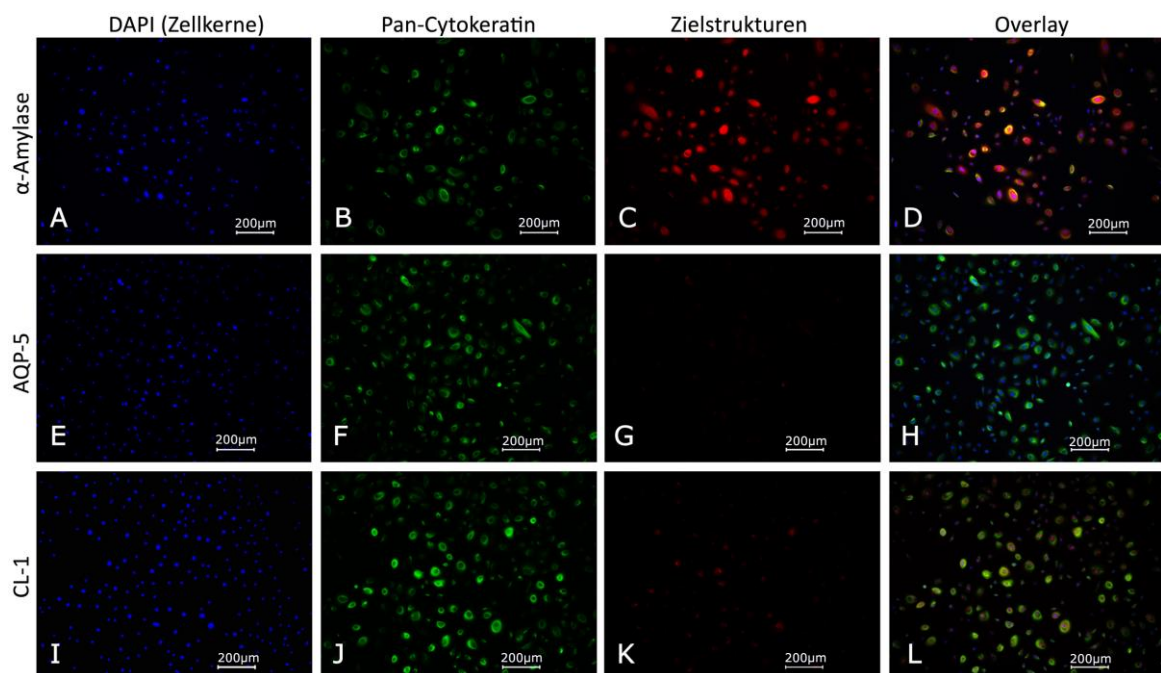


Abb. 19: Immunfluoreszenzaufnahmen der hSEZ in 2D-Kultur.

Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (A, E, I), die Zellkörper mit Panzytokeratin (B, F, J). Die Bilder D, H, L zeigen die jeweiligen Übereinanderlagerungen. Die Bilder A-D zeigen die Färbung gegen α -Amylase, E-H gegen AQP-5 und I-L gegen CL-1.

Bei CL-1 ergab sich eine schwache Anfärbung einiger Zellen (Abb. 19, Bild K, L), für Panzytokeratin zeigten sich nur geringe Schwankungen zwischen den Einzelexperimenten und eine allgemein gute Anfärbbarkeit.

3.4 Morphologie und Charakterisierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen auf der SIS-muc

3.4.1 Wachstumsmorphologie

Zur Analyse der Wachstumsmorphologie der hSEZ auf der SIS-muc wurden HE-Färbungen (Kapitel 2.6.4) und REM-Aufnahmen (Kapitel 2.9) angefertigt. In der Monokultur von hSEZ zeigte sich nach 7 Tagen Zellkulturdauer ein subkonfluenten Monolayer (Abb. 20, Bild A') auf der mukosalen Seite der SIS-muc. Außerdem waren in der Tiefe der mukosalen Schicht Zell-Cluster zu sehen (Abb. 20, Bild A'').

Nach 14 Tagen war die obere Zellschicht dichter als an Tag 7 (Abb. 20, Bild B'), auch die Größe der Zellcluster hatte im Gegensatz zu Tag 7 zugenommen (Abb. 20, Bild B''). In der Kokultur von hSEZ und mVEZ konnte nach 7 Tagen ebenfalls ein Monolayer von hSEZ nachgewiesen werden, der an einigen Stellen (Abb. 21, A') mit größeren Zellclustern konfluierte.

Die mVEZ hatten auf der serosalen einen Monolayer gebildet (Abb. 21, A''), welcher nach 14 Tagen Zellkulturdauer unverändert konfiguriert war (Abb. 21, B''). Auch die hSEZ zeigten nach 14 Tagen im Vergleich zum 7-tägigen Wachstum keine veränderte Zellmorphologie.

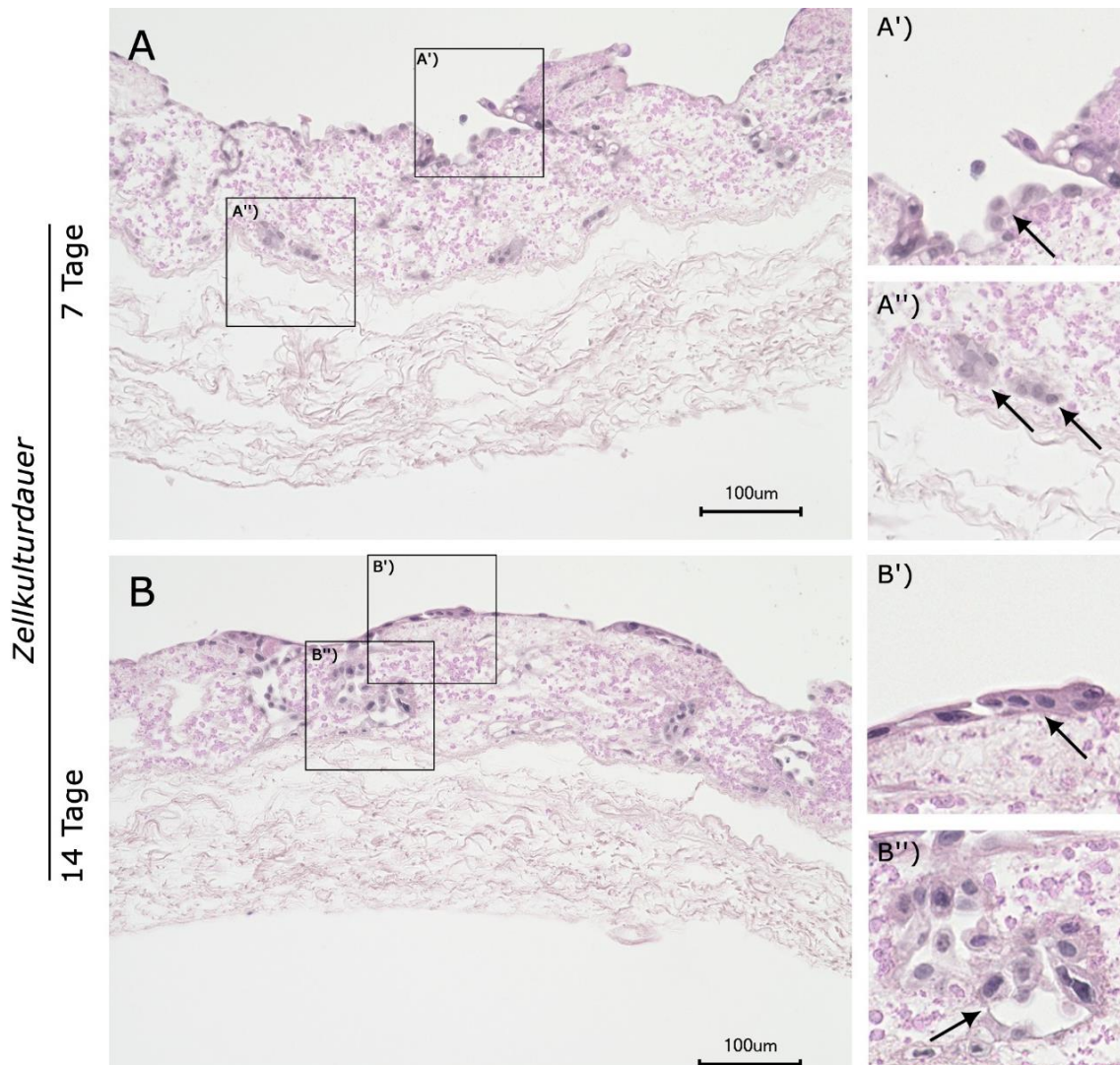


Abb. 20: HE-Färbungen der in Monokultur mit hSEZ besiedelten SIS-muc.

Bild A zeigt die mit hSEZ in Monokultur besiedelte SIS-muc nach 7 Tagen Zellkulturdauer. Als Vergrößerungen ist in A' der Monolayer auf der oberen, mukosalen Matrixseite zu sehen, A'' zeigt exemplarisch zwei der Zellcluster in der Tiefe der mukosalen Matrixseite. Bild B zeigt den Versuch nach 14 Tagen Zellkulturdauer. Der oberflächlich gelegene Monolayer imponiert dichter (B'), die Zellcluster sind vergrößert (B'').

Der direkte Vergleich zeigte keine großen Unterschiede in der Wachstumsmorphologie der Monokultur von hSEZ und der Kokultur mit mVEZ. In der Kokultur ließ sich jedoch bereits nach 7 Tagen eine etwas höhere Zelldichte der hSEZ als in der Monokultur feststellen (vgl. Abb. 20, A und Abb. 21, A).

Um ein differenzierteres Bild von der Wachstumsmorphologie der hSEZ zu erhalten, wurde die mukosale Seite der SIS-muc wie in Kapitel 2.9 beschrieben rasterelektronenmikroskopisch analysiert.

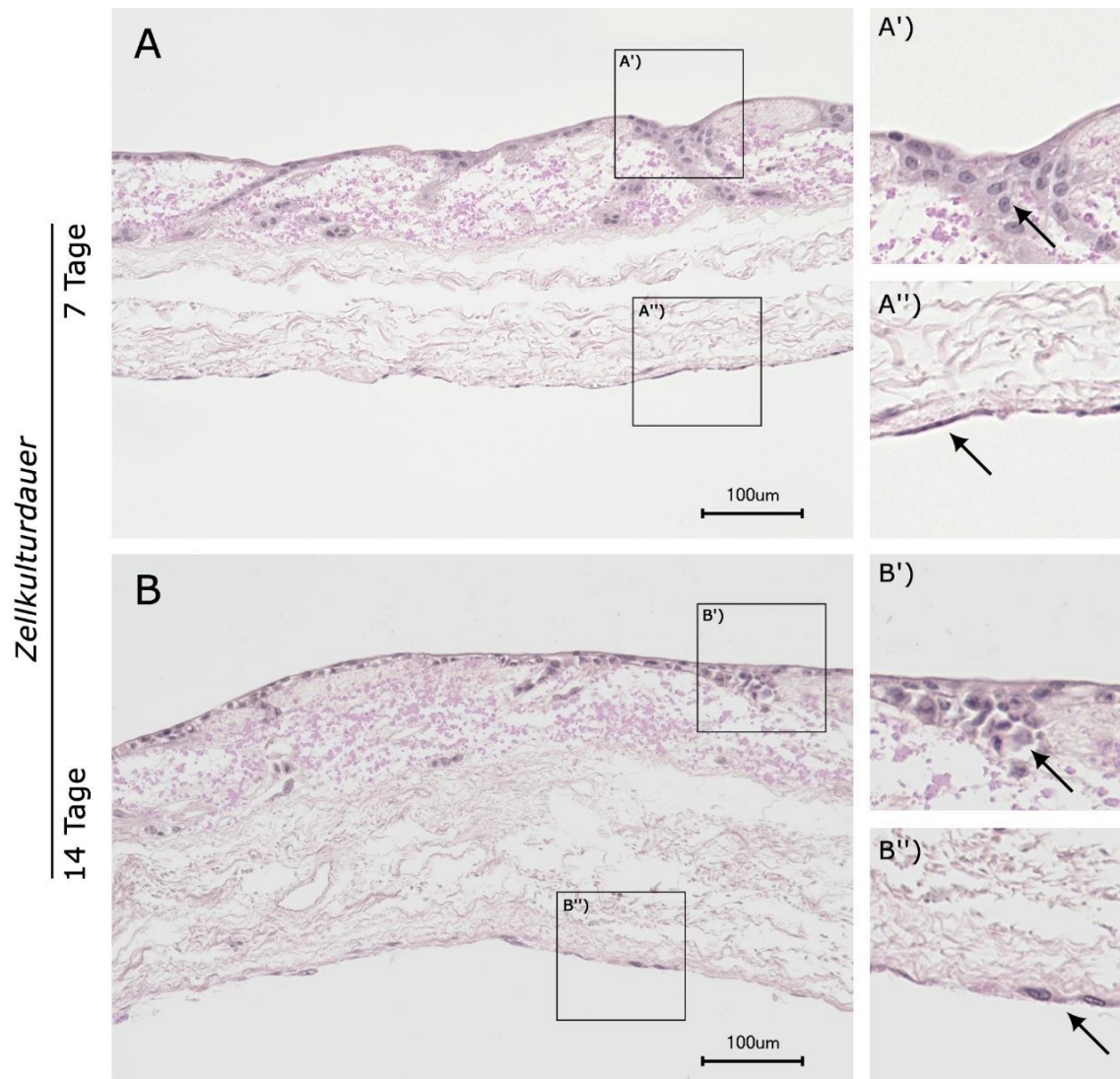


Abb. 21: HE-Färbungen der in Kokultur von hSEZ und mvEZ besiedelten SIS-muc.

Bild A zeigt die mit hSEZ und mvEZ in Kokultur besiedelte SIS-muc nach 7 Tagen Zellkulturdauer, auf A' ist ein mit dem mukosalen Monolayer konfluierendes Zellcluster dargestellt, A'' zeigt die serosale, mit mvEZ besiedelte Seite der SIS-muc. Bild B stellt das gleiche Setting nach 14 Tagen Zellkulturdauer dar, die Wachstumsmorphologie unterscheidet sich nicht wesentlich.

Hier zeigte sich ebenfalls eine konfluente Besiedelung der Matrix mit hSEZ. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen in die Vertiefungen der mukosalen Matrixseite hineinwuchsen. Abb. 22 zeigt die mit hSEZ besiedelte SIS-muc in der REM-Aufnahme.

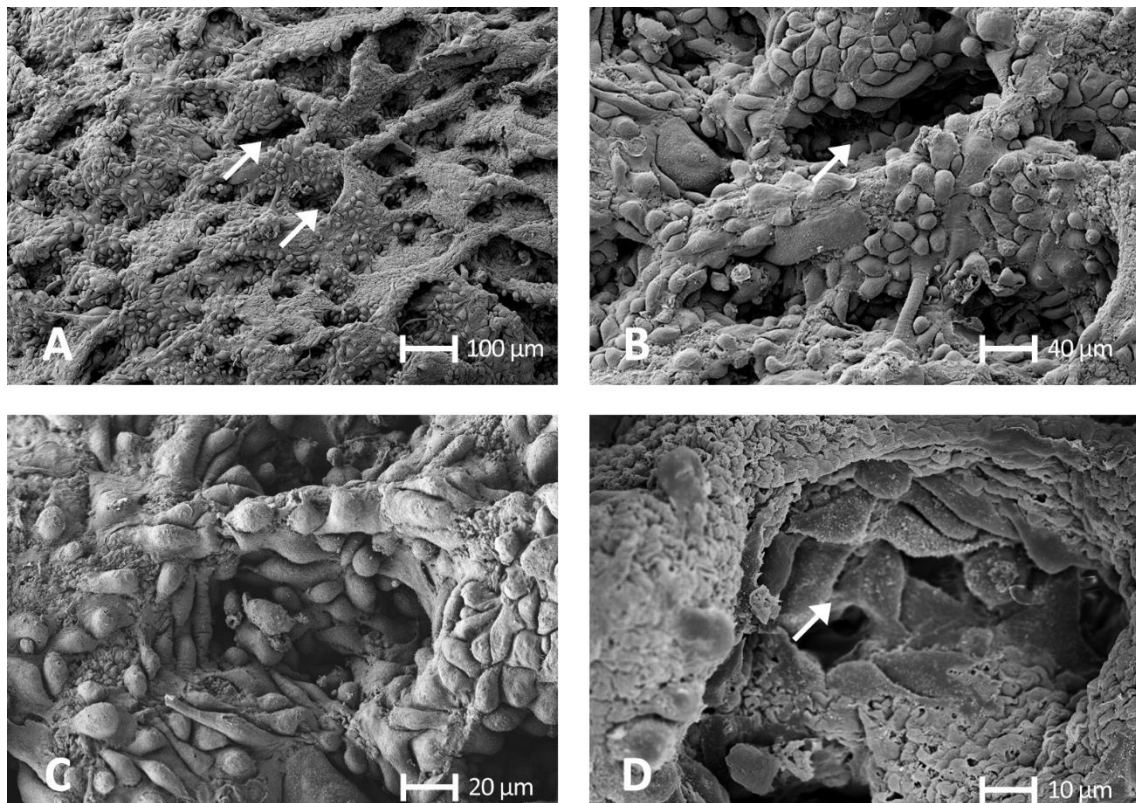


Abb. 22: REM-Aufnahmen der mit hSEZ besiedelten SIS-muc.

Auf den Bildern A und C sind Übersichten der mukosalen Seite der mit hSEZ besiedelten SIS-muc dargestellt, die Bilder B und D zeigen in vergrößerter Ansicht die durch die Zellen bewachsenen Vertiefungen.

Das Wachstum der mVEZ in der Kokultur beschrieb einen Monolayer auf der serosalen Seite der SIS-muc. Hierbei waren nach 7 Tagen teils noch zellfreie Areale zu sehen (vgl. hierzu Abb. 21, A und Abb. 23 A), nach 14 Tagen stellte sich die entsprechende Zellschicht nahezu lückenlos dar.

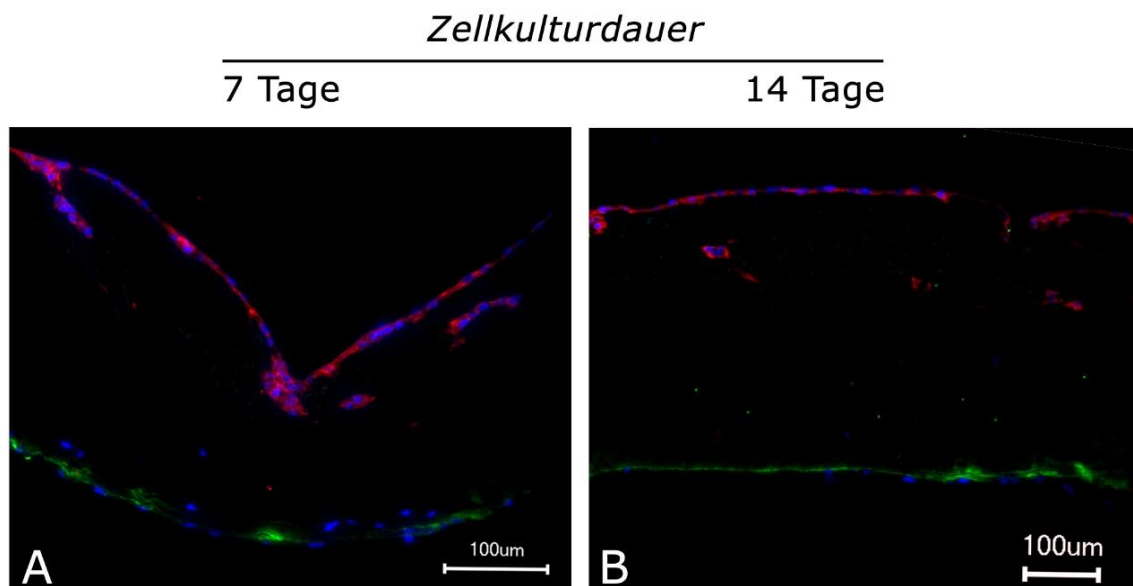


Abb. 23: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mVEZ auf der SIS-muc gegen vWF (grün) und Panzytokeratin (rot).

Bild A zeigt die SIS-muc nach 7, Bild B nach 14 Tagen. Die hier anders als in den übrigen Färbungen rot gefärbten hSEZ bilden auf der mukosalen Seite einen Monolayer und tiefer gelegene Cellcluster, die grün gefärbten mVEZ wachsen im Monolayer auf der serosalen Matrixseite.

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Um die in 3D-Kultur besiedelte SIS-muc charakterisieren zu können, wurden die bereits im nativen Speicheldrüsengewebe und in der 2D-Kultur der hSEZ bestimmten Zielmarker α -Amylase, AQP-5, CL-1 sowie der Epithelzellmarker Panzytokeratin analysiert. Außerdem erfolgte eine Färbung gegen vWF, einen spezifischen Marker für Endothelzellen (vgl. Abb. 23).

In der Monokultur von hSEZ waren nach 7 Tagen Zellkulturdauer in der oberen Zellschicht einige der Zellen gegen α -Amylase anfärbbar (Abb. 24, Bild A), nach 14 Tagen war der Anteil dieser Zellen erhöht. Viele der tiefer gelegenen Zellcluster, die nach 14 Tagen vergrößert waren, waren nun ebenfalls kräftig α -Amylase-positiv (Abb. 24, Bild B, B').

In der Kokultur von hSEZ und mVEZ waren nach 7 Tagen Zellkulturdauer analog zur Monokultur lediglich einige Zellen der oberflächlichen Schicht α -Amylase-positiv (Abb. 25, A, A'). Nach 14 Tagen Zellkulturdauer war die Zahl der α -Amylase-positiven Zellen in der oberen Zellschicht erhöht (Abb. 25, B). Demgegenüber waren die tieferen Zellcluster nach 7 Tagen nicht gegen α -Amylase anfärbbar, nach 14 Tagen hingegen waren sie deutlich α -Amylase-positiv.

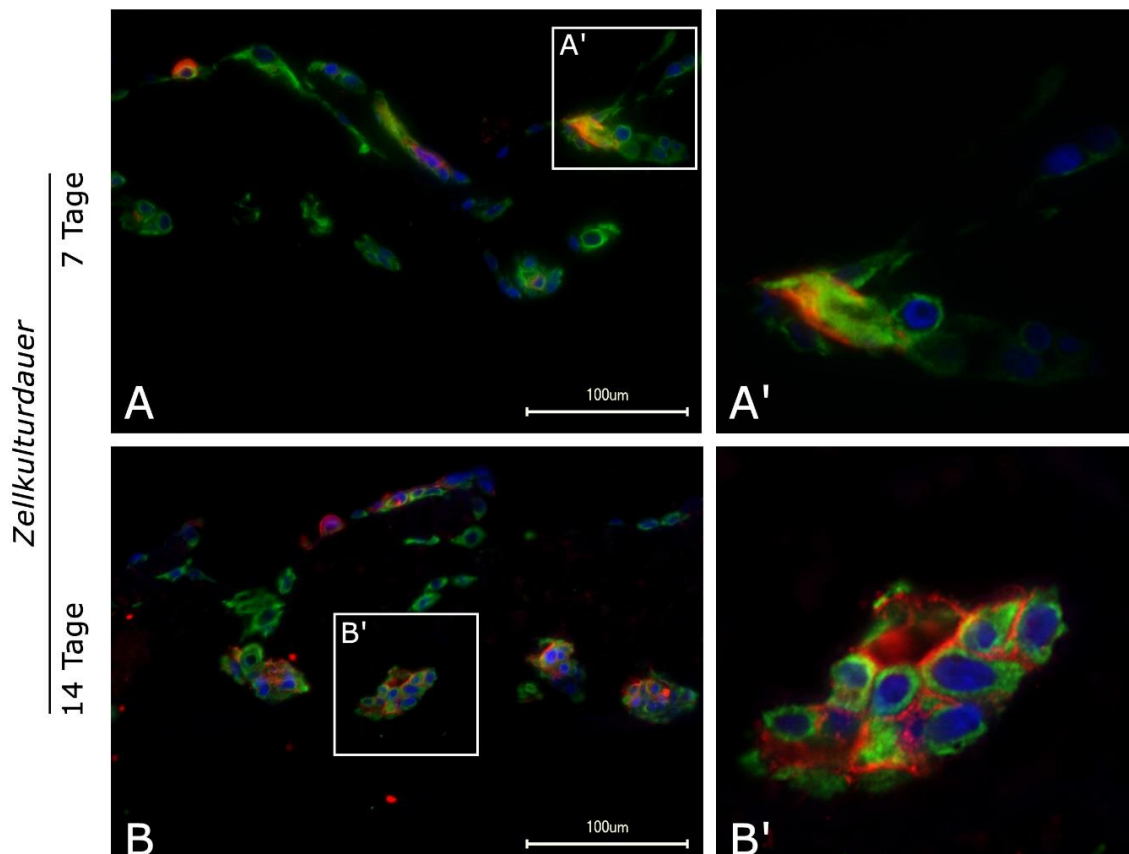


Abb. 24: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Monokultur von hSEZ auf der SIS-muc gegen α -Amylase (rot) und Panzytokeratin (grün).

Bild A zeigt die besiedelte SIS-muc nach 7 Tagen Zellkulturdauer, einige der oberflächlichen Zellen sind gegen α -Amylase anfärbbar. Nach 14 Tagen Zellkulturdauer (Bild B) ist ein größerer Anteil der oberflächlichen hSEZ α -Amylase-positiv, ebenso wie die im Verlauf vergrößerten, tiefer gelegenen Zellcluster (Bild B').

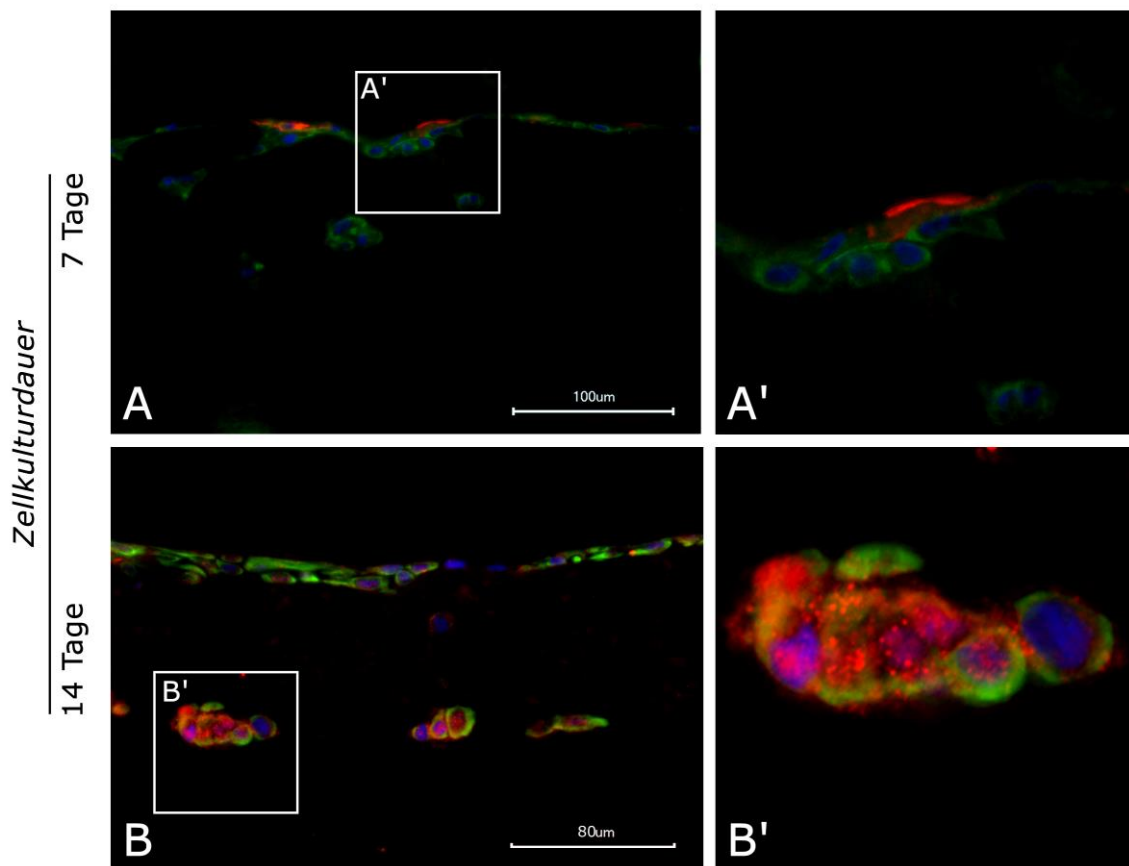


Abb. 25: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mVEZ auf der SIS-muc gegen α -Amylase (rot) und Panzytokeratin (grün).

Auf Bild A erkennt man einzelne α -Amylase-positive Zellen im Monolayer nach 7 Tagen Zellkulturdauer, die tieferen Zellcluster sind nicht anfärbbar. Nach 14 Tagen Zellkulturdauer ist der Anteil der α -Amylase-positiven hSEZ im Monolayer deutlich angestiegen, darüber hinaus zeigen sich kräftig gegen α -Amylase anfärbbare Zellcluster in den Vertiefungen der Matrix.

Bei der Anfärbung gegen AQP-5 in der Monokultur von hSEZ ergab sich nach 7 und 14 Tagen Zellkulturdauer vor allem in den tieferen Zellclustern (Abb. 26, Bild A' und B') ein starkes Signal für AQP-5. In der Mehrzahl stellte sich dies so dar, dass innerhalb des Zellclusters zusammenhängende Zellformationen positiv für AQP-5 waren, wohingegen andere Teile des Clusters nicht anfärbbar waren.

Auch in der oberen Zellschicht (Abb. 26, Bild B) waren nach 14 Tagen viele Zellen positiv für AQP-5, beim hier gezeigten Präparat für 7 Tage Zellkultur ist diese nicht angeschnitten.

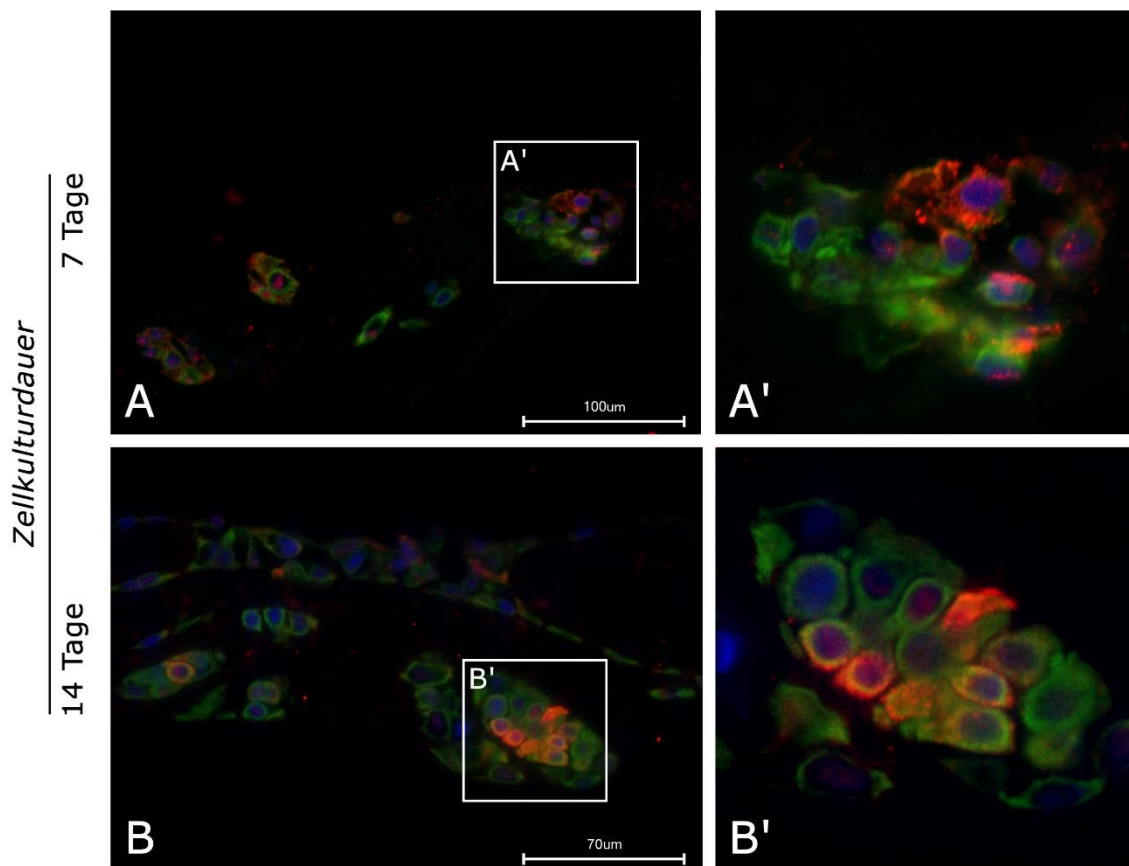


Abb. 26: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Monokultur von hSEZ auf der SIS-muc gegen AQP-5 (rot) und Panzytokeratin (grün).

Bild A zeigt AQP-5-positive Zellcluster auf der 7 Tage lang besiedelten SIS-muc, der Monolayer auf der Matrixoberfläche ist hier nicht angeschnitten. Auf A' ist gezeigt, dass nicht alle Zellen eines Clusters positiv sind. Bild B zeigt die gegen AQP-5-anfärbbaren Cluster und Zellen des oberflächlichen Monolayers nach 14 Tagen Zellkulturdauer.

In der Kokultur waren sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen Zellkulturdauer die tieferen Zellcluster (Abb. 27 B') positiv für AQP-5. Außerdem zeigten sich hier bei beiden Zellkulturzeiten auch innerhalb der oberen Zellschicht AQP-5-positive Zellen (Abb. 27, A, A', B).

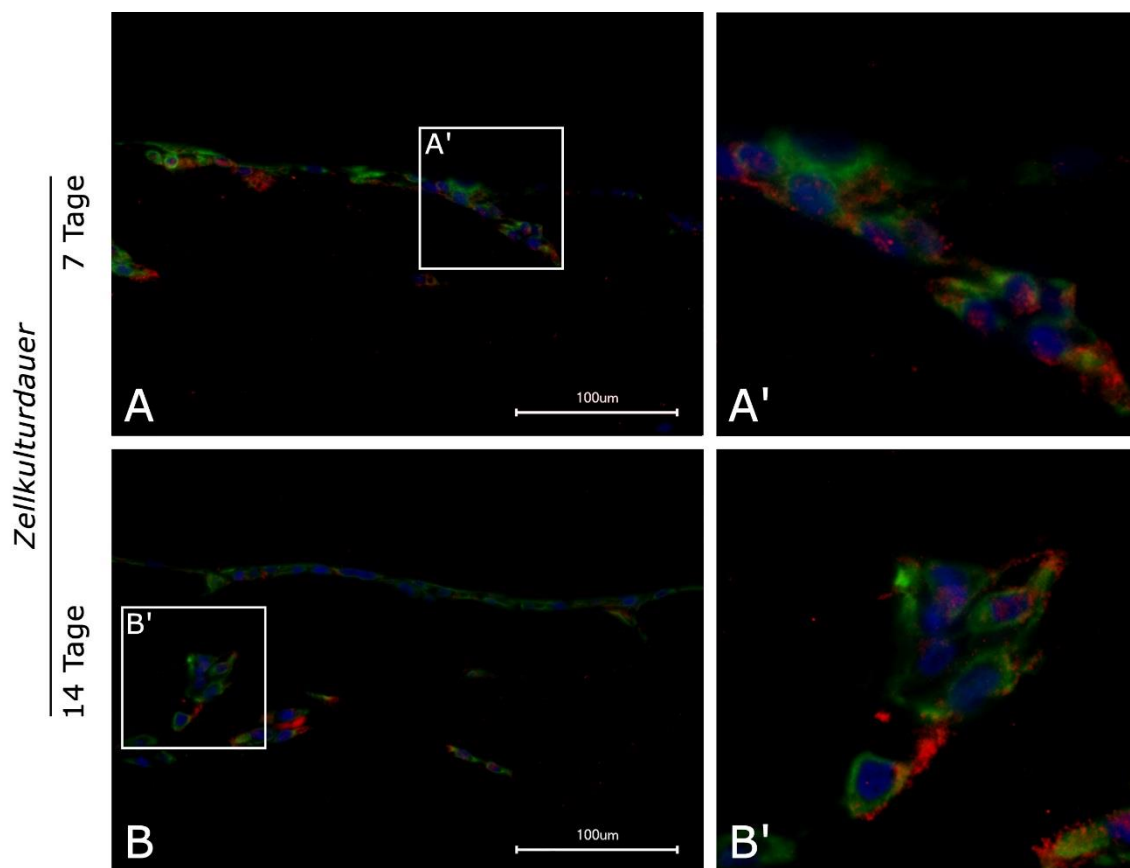


Abb. 27: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mVEZ auf der SIS-muc gegen AQP-5 (rot) und Panzytokeratin (grün).

Die Bilder A und B zeigen die besiedelte SIS-muc nach 7 und 14 Tagen Zellkulturdauer mit AQP-5-positiven Zell-Formationen in der oberen Zellschicht und in den tiefer gelegenen Zellclustern, A' und B' stellen einzelne Zellkomplexe in vergrößerter Ansicht dar.

Die Immunfluoreszenzfärbungen gegen CL-1 ergaben bei der Monokultur von hSEZ nach 7 Tagen Zellkulturdauer eine Anfärbung bei einigen Zellen der oberflächlichen Zellreihe (Abb. 28, Bild A und A'). Nach 14 Tagen Zellkulturdauer waren neben den oberen Zellen auch solche der tieferen Zellcluster gegen CL-1 anfärbbar (Abb. 28, Bild B und B'').

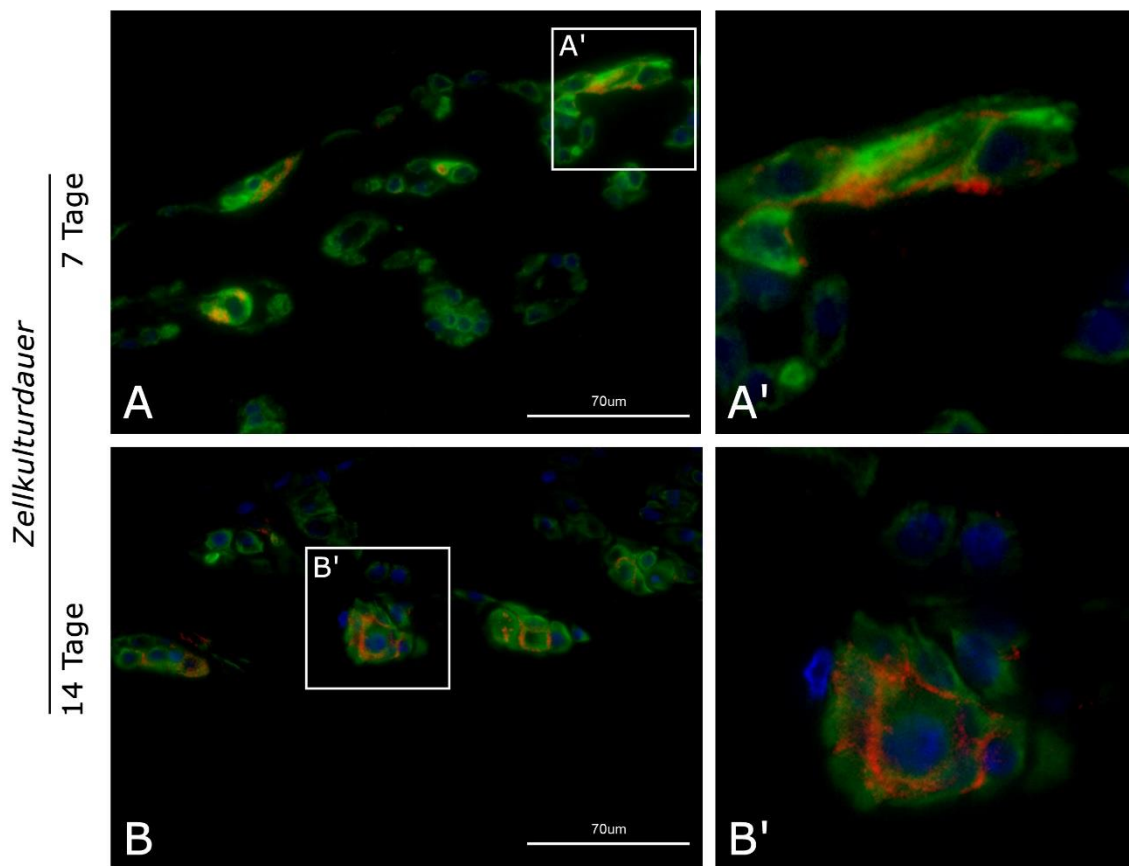


Abb. 28: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Monokultur von hSEZ auf der SIS-muc gegen CL-1 (rot) und Panzytokeratin (grün).

Auf den Bildern A und B sind Abschnitte der 7 bzw. 14 Tage besiedelten SIS-muc zu sehen, die CL-1-positive Zellformationen enthalten. Nach 14 Tagen war ein größerer Anteil der Zellcluster CL-1-positiv. Die Bilder A' und B' zeigen gegen CL-1 anfärbbare Zellen in jeweils vergrößerter Darstellung. Die Expression von CL-1 imponiert hierbei randständig an den Zellen, was dessen physiologischer Lokalisation in der Zellmembran entspricht.

In der Kokultur waren nach 7 Tagen Zellkulturdauer nur Einzelzellen positiv für CL-1 (Abb. 29, Bild A'), wohingegen nach 14 Tagen der Großteil der oberen Zellschicht gegen CL-1 anfärbbar war (Abb. 29, Bild B).

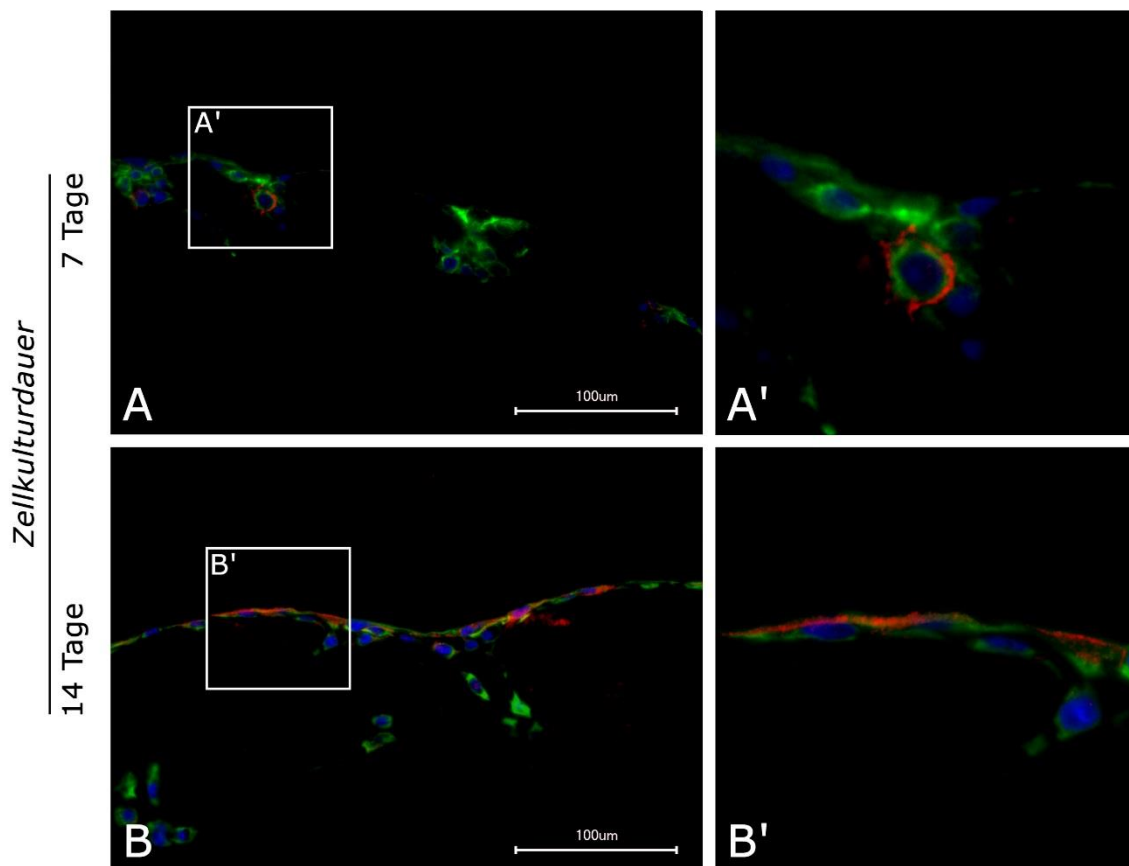


Abb. 29: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mVEZ auf der SIS-muc gegen CL-1 (rot) und Panzytokeratin (grün).

Bild A zeigt Zellcluster nach 7 Tagen Zellkulturdauer, die fast gänzlich CL-1-negativ sind. A' zeigt ein Cluster mit einer einzelnen positiven Zelle. Auf Bild B ist die 14 Tage besiedelte SIS-muc dargestellt, der Monolayer aus hSEZ ist zum größten Teil CL-1-positiv, die unteren Zellcluster negativ.

3.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der transelektronenmikroskopischen Analyse der mit hSEZ in Monokultur besiedelten SIS-muc zeigten zahlreiche Zellen Merkmale vitaler Epithelzellen. So konnten bei vielen der dargestellten hSEZ Zell-Zell-Kontakte nachgewiesen werden (Abb. 30, A', A''). Außerdem wiesen die Zellen Mitochondrien und Mikrovilli auf (Abb. 30, A'', A''').

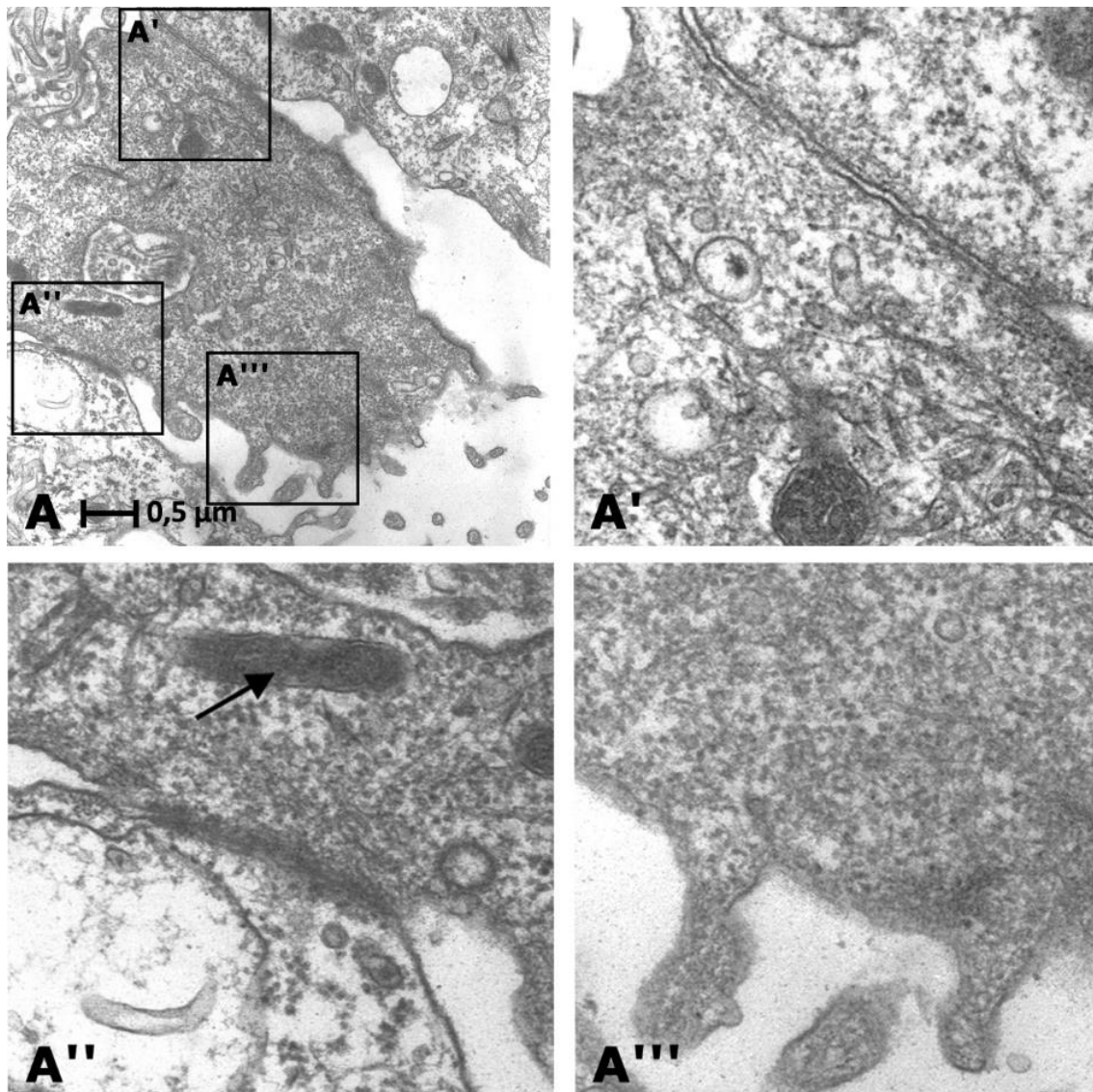


Abb. 30: TEM-Aufnahmen von auf der SIS-muc kultivierten hSEZ mit Teilvergrößerungen.

Bild A' und A'' zeigen vergrößerte Ausschnitte der beiden auf Bild A dargestellten Zell-Zell-Kontakte, Bild A'' zeigt ein Mitochondrium (Pfeil). Auf Ausschnitt A''' sind Mikrovilli zu sehen.

Überdies beinhalteten viele der Zellen sekretorische Vesikel (Abb. 31, C). Es konnten leere, lumina-ähnliche Räume zwischen den Zellen nachgewiesen werden, an deren Grenzen die Zellen Merkmale der Apoptose aufwiesen (Abb. 31, A, B).

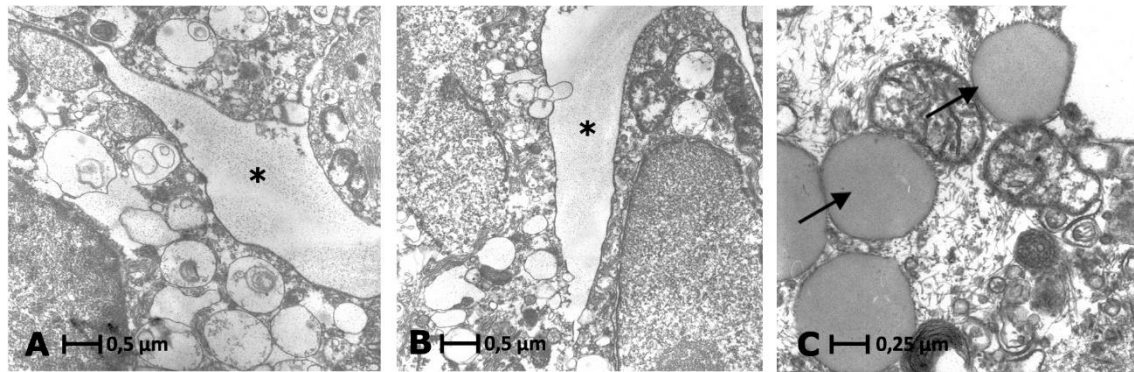


Abb. 31: TEM-Aufnahmen von Lumina-ähnlichen interzellulären Räumen und sekretorischen Vesikeln bei auf der SIS-muc kultivierten hSEZ.

Die Bilder A und B zeigen Lumina-ähnliche Räume (Sterne) zwischen den hSEZ. Die angrenzenden Zellen weisen eine schlechte Strukturhaltung auf (aufgequollene Mitochondrien, strukturlose rundliche Bereiche). Auf Bild C sind sekretorische Vesikel dargestellt (Pfeile).

3.4.4 α -Amylase-Genexpression und Enzymaktivität

Die mittels RT-qPCR durchgeführte Analyse der Genexpression zeigte, dass sowohl die 3D-Mono-, als auch die 3D-Kokultur nach 7 und 14 Tagen Zellkulturdauer eine gegenüber der 2D-Kultur erhöhte Genexpression aufwiesen. Es ist zu erkennen, dass die α -Amylase-Expression der 3D-Monokultur zu beiden Messzeitpunkten konstant 2,97mal so hoch war wie die der 2D-Kultur. Die hSEZ der 3D-Kokultur hingegen zeigten nach 7 Tagen eine gegenüber der 2D-Kultur 1,92-fach und nach 14 Tagen eine 2,33-fach erhöhte α -Amylase-Expression. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 32 dargestellt.

Die Variabilität zwischen den drei untersuchten biologischen Replikaten war sowohl bei der α -Amylase-Enzymaktivitätsmessung als auch bei der Genexpression hoch, sodass beim Mittelwertvergleich trotz eindeutig erkennbarer biologischer Trends im Post-Hoc-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den 3D-Kulturen und der 2D-Kontrolle festgestellt werden konnte.

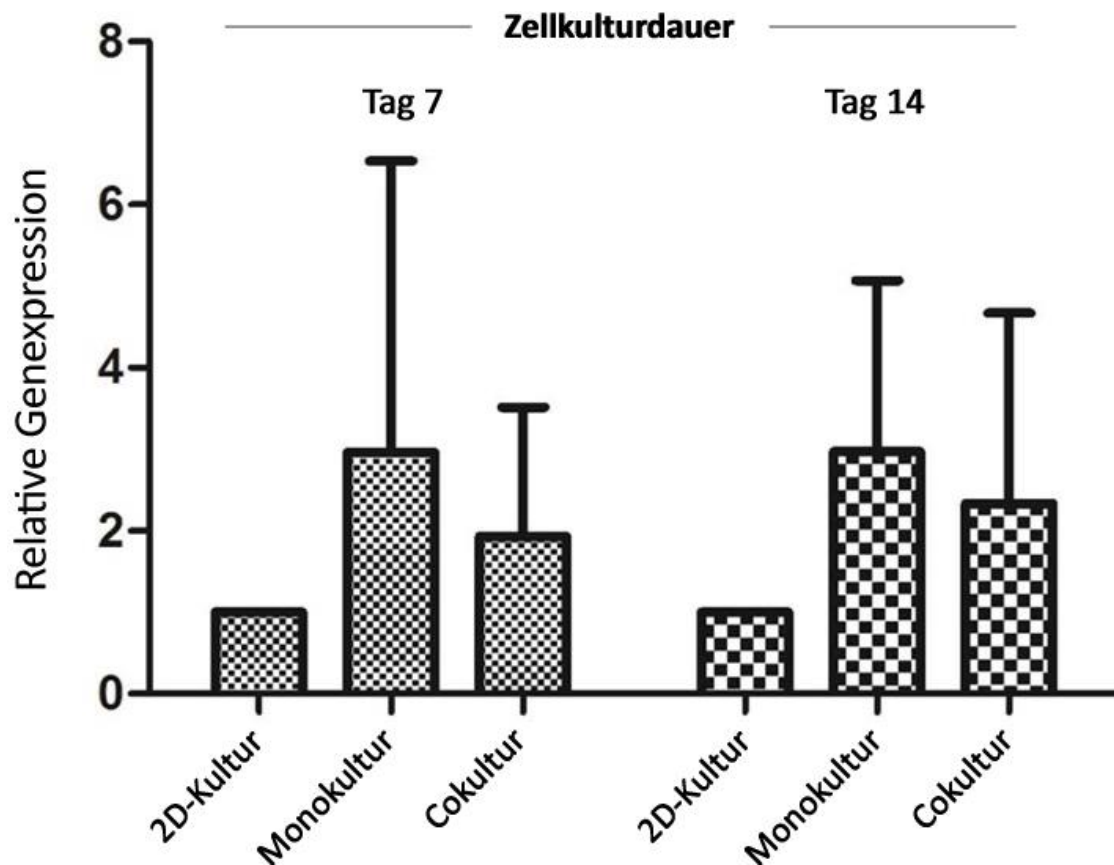


Abb. 32: α -Amylase-Genexpression bei 2D-Kultur und 3D Mono- und Kokultur.

Zur Darstellung kommen die gegen CK18 normalisierten und über alle biologischen Replikate gemittelten α -Amylase-mRNA-Expressionslevel nach 7 und 14 Tagen Zellkulturdauer.

Sowohl die Zellen der 2D- als auch der 3D-Kultur wurden wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben durch Immunfluoreszenzfärbungen auf das Vorhandensein von α -Amylase überprüft. Um zu analysieren, ob eine Exkretion von α -Amylase stattfindet und wie stark die Enzymaktivität ausfällt, erfolgte wie in 2.8.3 erläutert eine photometrische Analyse der Enzymaktivität sowohl im gesammelten Medium-Überstand aus den Zellkronen der 3D-Kultur als auch im Kulturmedium der 2D-Kultur. Außerdem wurde die α -Amylase-Genexpression in Zellen der 3D-Mono- und -kokultur sowie der 2D-Kultur durch RT-qPCR-Analyse verglichen und mit den Ergebnissen des Enzymaktivitäts-Assay korreliert. Zur Bestimmung der α -Amylase-Enzymfunktion wurden in 3-Tages-Intervallen jeweils 300 μ l Medium aus den Zellkronen-Überständen der 3D- und Zellkulturflaschen der 2D-Kultur asserviert.

In Abb. 33 sind die gemittelten Ergebnisse der α -Amylase-Enzymaktivitätsmessungen aufgeführt. In allen drei Versuchen zeigten sich für die 2D-Kultur sowie für die 3D-Monokultur von hSEZ über die gesamte Zellkulturdauer durchgehend sehr niedrige α -Amylase-Enzymaktivitäten von unter 0,1 mU/ml Medium. Diese zeigten im Verlauf der Zellkultur zwischen den Testzeitpunkten keine erkennbare Dynamik. Im Gegensatz hierzu ergab sich bei der 3D-Kokultur von hSEZ mit mvEZ eine zu allen Messzeitpunkten vielfach höhere α -Amylase-Aktivität, die zwar von Tag 3 bis Tag 9 einen negativen Trend beschrieb, an Tag 12 jedoch über das Ausgangsniveau von Tag 3 hinaus anstieg.

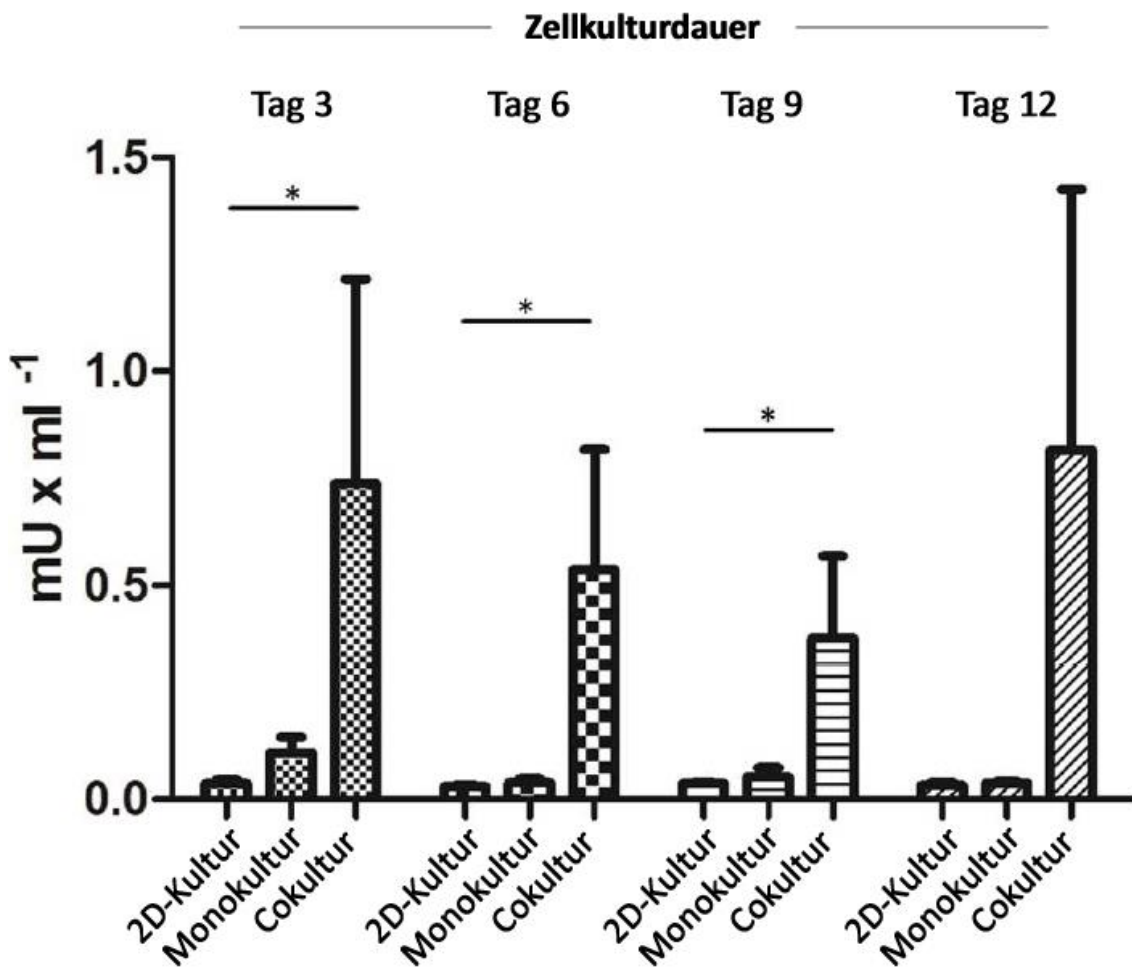


Abb. 33: α -Amylase-Enzymaktivitätsmessungen bei 2D-Kultur und 3D Mono- und Kokultur.

Darstellung der gemittelten Enzymaktivitäten zu unterschiedlichen Messzeitpunkten mit Standardabweichung. Statistisch signifikante Abweichungen der 3D- von der 2D-Kultur sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Versuche erfolgten in n=3 biologischen Replikaten.

3.5 Gradienten-PCR und Primereffizienzbestimmung

Zur Funktionsüberprüfung der Primer und zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für die RT-qPCR erfolgte mit den Produkten der Gradienten-PCR eine Gelelektrophorese. Diese zeigte bei allen verwendeten Primern Banden, deren Ausprägung sich bei den verschiedenen getesteten Annealing-Temperaturen nicht unterschied (vgl. Abb. 32). Die Produktlänge befand sich im Bereich von 150–300 Basenpaaren (bp). Sie wurde anhand der DNA-Leiter abgelesen, die aus 14 chromatographisch aufgereinigten, einzelnen DNA-Fragmenten bestand. Diese umfassten 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 Basenpaare. Anhand der Ergebnisse wurde die Annealing-Temperatur für die RT-qPCR auf 61° C festgelegt.

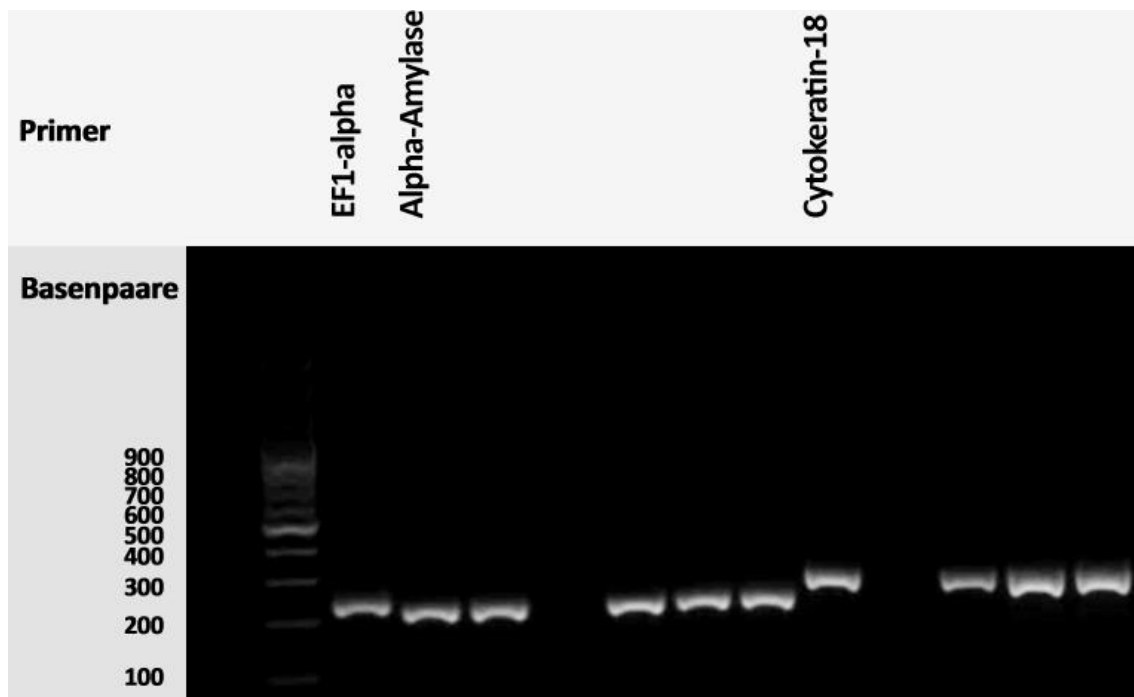


Abb. 34: Gelelektrophorese von EF1 α , α -Amylase und Zytokeratin 18.

Das Gel enthält folgende Banden: EF1 α (Positivkontrolle); α -Amylase (bp 221): 51°C, 52,8°C, Negativkontrolle, 57,4°C, 59,2°C, 61°C; Zytokeratin 18 (bp 278): 53,7°C, Negativkontrolle, 57,4°C, 59,2°C, 61°C

Die Ergebnisse der Primereffizienzbestimmung (vgl. Kapitel 2.13.6) lagen für α -Amylase bei 101,1%, für CK-18 bei 100,5%, für GAPDH bei 100,3% und für EF1 α bei 102,7% (vgl.

Abb. 35), sodass die Ergebnisse der verwendeten Primer in der RT-qPCR als valide betrachtet werden konnten.

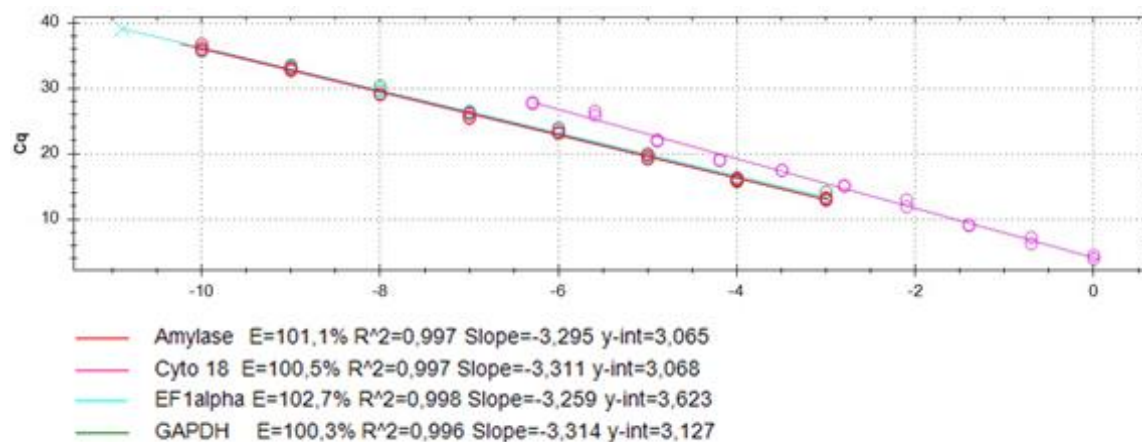


Abb. 35: Primereffizienzbestimmung von EF1 α , GAPDH, α -Amylase und Zytokeratin 18.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Matrix SIS-muc für das Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse geeignet ist. Hierzu wurde die Wachstumsmorphologie der Zellen, die Ausprägung wichtiger gewebs- bzw. organspezifischer Merkmale sowie die Zellfunktion anhand der Genexpression und der Enzymfunktion von α -Amylase analysiert. Als Vergleichsreferenz für diese Untersuchungen diente die 2D-Plastik-Kultur der hSEZ. Bei der 3D-Kultur auf der SIS-muc erfolgte neben der Monokultur außerdem eine Kokultur mit mvEZ, um deren Einfluss auf Wachstum, Differenzierung und Funktion der hSEZ zu evaluieren.

4.1 Charakterisierung der humanen Speicheldrüsenepithelzellen in 2D-Kultur

Bei der Charakterisierung primärer Zellen wird untersucht, in wieweit deren gewebsspezifische Merkmale unter Kulturbedingungen erhalten bleiben bzw. wie sie sich verändern. Um dies zu bewerten, erfolgten immunfluoreszenzgestützte Doppelfärbungen der hSEZ. Hierbei wurde zunächst gegen Panzytokeratin als typischen Epithelzellmarker gefärbt, um die Zellkörper sichtbar zu machen. Außerdem erfolgte die Anfärbung gegen die drei spezifischen Zielmarker α -Amylase, Claudin-1 (CL-1) und

Aquaporin-5 (AQP-5). α -Amylase bildet den größten Anteil unter den Verdauungsenzymen des Speichels [77] und spaltet Stärke-Moleküle in Oligosaccharide, indem die darin enthaltenen 1,4- α -glykosidischen Bindungen zwischen den Zuckermolekülen aufgetrennt werden. AQP-5 ist ein essenzielles Kanalprotein bei der Produktion hypotonen Speichels [78], bei Mäusen mit einem Defekt des AQP-5-Gens zeigte sich eine deutliche Reduktion des induzierten Speichelflusses [79]. Sowohl α -Amylase als auch AQP-5 werden in den azinären Zellen der Speicheldrüse exprimiert, wobei α -Amylase intrazellulär und AQP-5 an der apikalen Zellmembran lokalisiert ist [80, 81]. Als drittes Zielantigen wurde CL-1 gewählt. Claudine sind Bestandteile von Schlussleistenkomplexen, die Interzellularräume verschließen und so zum Aufbau von Zellbarrieren beitragen. In der Speicheldrüse zeichnet sich der Subtyp CL-1 dadurch aus, dass er in duktalem, nicht jedoch in azinären Zellen vorkommt [75]. Die entsprechende spezifische Verteilung dieser untersuchten Marker wurde zunächst durch Immunfluoreszenzfärbungen an Nativpräparaten nachvollzogen. α -Amylase und AQP-5 dienten somit zur Identifizierung azinärer, CL-1 zur Anfärbung duktalem Zellkomplexen, also solcher, die dem Ausführungsgangsystem der Speicheldrüse zugerechnet werden können.

Nach einer Zellkulturdauer von 14 Tagen zeigte sich in der Phasenkontrastmikroskopie ein Konfluenzgrad von ca. 80 %, wobei die Zellkörper der hSEZ durchgehend monomorph-polygonal konfiguriert waren. In einer Arbeit von Chan et al. aus dem Jahre 2011 zeigte sich ein ähnlicher Zellauspekt, wobei entsprechende Konfluenzgrade dort erst nach 21 Tagen Zellkulturdauer erreicht werden konnten [82]. In der Immunfluoreszenzmikroskopie der hSEZ ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine ähnlich starke Anfärbung der in 2D-Kultur kultivierten hSEZ gegen α -Amylase wie im Nativpräparat. Die Anfärbbarkeit gegen AQP-5 war nicht gegeben, einige der Zellen waren jedoch positiv für CL-1. Der Verlust der AQP-5-Expression als Zeichen der Entdifferenzierung von hSEZ des azinären Typs korreliert mit dem von Szlavik et al. 2008 beschriebenen Verlust azinärer Differenzierungsmerkmale in der 2D-Plastik-Kultur [83]. Vergleicht man das vorliegende Anfärbungsprofil hingegen mit den Ergebnissen von Chan et al., so zeigt sich, dass dort AQP-5 in der 2D-Kultur nachweisbar war, wenn auch

in deutlich schwächerer Ausprägung als im Nativpräparat. Des Weiteren zeigte sich bei Chan et al. eine im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen deutlich geringere Anfärbbarkeit gegen α -Amylase. Diese Unterschiede im Anfärbungsprofil insbesondere gegen AQP-5 könnten darin begründet liegen, dass bei Chan et al. vor Inkulturnahme eine gezielte Selektion von azinären Zellen aus den Speicheldrüsenpräparaten erfolgte.

Die Ergebnisse des α -Amylase-Assays und der RT-qPCR-Analyse der Genexpression der 2D-Kultur werden in den folgenden Kapiteln im direkten Vergleich zu den Ergebnissen der 3D-Kultur behandelt.

4.2 Charakterisierung der 3D-Kultur humaner Speicheldrüsenepithelzellen und Vergleich mit der 2D-Kultur

Wie bereits ausgeführt, spielt AQP-5 eine wichtige Rolle bei der Regulation des azinären Wassertransports und der Sekretion des Speichels. Bei Patienten mit stattgehabter Bestrahlung der Kopf-Hals-Region und konsekutiv vermindertem Speichelfluss konnte eine verminderte AQP-5-Expression festgestellt werden [84]. Im Gegensatz zur 2D-Kultur zeigten hSEZ in der 3D-Kultur in der Immunfluoreszenzfärbung vor allem in den tiefer gelegenen Zellclustern eine starke Anfärbbarkeit gegen AQP-5. Diese ist ein wichtiges Indiz für eine im Gegensatz zur 2D-Kultur erhaltene azinäre Differenzierung dieser Zellareale innerhalb der 3D-Kultur der hSEZ. Die in Kapitel 3.4.2 beschriebene gute Anfärbbarkeit gegen α -Amylase an ähnlicher Lokalisation stützt diese Hypothese. Die Anfärbbarkeit gegen CL-1, die in der 2D-Kultur (vgl. Kapitel 3.3) eher schwach ausgeprägt war, zeigte sich in der 3D-Kultur im Vergleich nicht so deutlich gesteigert wie bei AQP-5 und α -Amylase. Hier bestand jedoch eine zeitliche Dynamik, denn nach 14 Zellkulturtagen war sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur die Zahl der gegen CL-1 anfärbaren Zell-Areale im Vergleich zum Vorzeitpunkt erhöht, sodass naheliegt, dass die duktale Differenzierung eher zeitversetzt in der zweiten Zellkulturwoche erfolgte.

In den Messungen der gegen CK18 normalisierten und über die 3 Versuche gemittelten Genexpression von α -Amylase zeigten sich in der 3D-Monokultur um den Faktor 2,97 (Tag 7, 14) und in der 3D-Kokultur um den Faktor 1,92 (Tag 7) bzw. 2,33 (Tag 14) erhöhte Werte gegenüber der 2D-Kultur. Dies zeigt zwar den biologischen Trend, dass die

Genexpression in der 3D-Kultur sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur der 2D-Kultur überlegen war, aufgrund der hohen Abweichungen zwischen den drei Versuchen und einer ergebnislosen Einzelprobe waren diese Ergebnisse jedoch insgesamt nicht statistisch signifikant.

Die transmissionselektronenmikroskopische Analyse der auf der SIS-muc kultivierten hSEZ zeigte verschiedene Merkmale vitalen, differenzierten Speicheldrüsen-Epithelgewebes. Hierzu zählten insbesondere die gute intrazelluläre Strukturhaltung mit dichtem Zytoplasma und intrazellulären Vesikeln, das Vorhandensein von Mikrovilli sowie die Ausprägung von Tight junctions. Letztere sind unerlässlich für den Aufbau einer Epithelbarriere und die gerichtete Sekretion von Elektrolyten, Flüssigkeiten und Proteinen. Die in der TEM nachgewiesene, intakte Ultrastruktur der hSEZ unterstreicht in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzmikroskopie den hohen Differenzierungsgrad der hSEZ.

Neben den oben genannten Strukturen konnten freie interzelluläre Räume innerhalb des Zellverbundes nachgewiesen werden. Um diese herum waren präapoptotische Zellen mit einer schlechten Strukturhaltung erkennbar. Verschiedene Studien belegen, dass Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Lumina während der Entwicklung der Speicheldrüse spielt und dass apoptotische Zellen hierbei in unmittelbarer Nähe zu den entstehenden Lumina liegen [85, 86], sodass die beschriebenen Beobachtungen ebenfalls als Hinweis für eine drüsentypische Gewebsdifferenzierung gewertet werden können.

Primäre Zellen, wie die in dieser Arbeit verwendeten hSEZ und mvEZ unterliegen einigen Limitationen: Sie sind hochdifferenziert, also nicht wandlungsfähig, die Verfügbarkeit ist verglichen mit Stammzelllinien gering, die Gewinnung des Zellmaterials invasiver Natur. Darüber hinaus sind Primärzellen potentiell durch somatische Mutationen betroffen [46]. Embryonale (ES) bzw. mesenchymale Stammzellen (MS) weisen hingegen ein hohes Differenzierungspotential auf, das beispielsweise für die Regeneration von Knochengewebe nutzbar gemacht werden kann [87]. Ein Nachteil besteht hier in den kontrovers diskutierten ethischen Implikationen der Verwendung embryonaler Stammzellen und in der notwendigen Kontrolle der Zelldifferenzierung. Die bereits in

Kapitel 1.5.3 eingeführten induzierten, pluripotenten Stammzellen (iPS) vereinen hohe Verfügbarkeit mit einem herausragenden Differenzierungspotential – kürzlich konnte mittels 3D-Bioprinting von iPS die erfolgreiche Herstellung von Knorpelgewebe erreicht werden [88]. Die wichtigste Einschränkung dieses Zelltyps besteht in dem mit der Pluripotenz einhergehenden onkogenen Potential, das ein potentiell Hindernis auf dem Weg zur klinischen Translation darstellt.

4.3 Vergleich der 3D-Monokultur humaner Speicheldrüsenepithelzellen mit der 3D-Kokultur mit mikrovaskulären Endothelzellen

Viele Studien beschäftigen sich mit den Mechanismen, wie hSEZ durch Bestrahlung geschädigt werden. Hierzu existieren im Wesentlichen zwei verschiedene pathomechanistische Erklärungsansätze: Zum einen eine direkte DNA-Schädigung durch strahlungsinduzierte Doppelstrangbrüche [89], zum eine Zellmembranschädigung, die über das Sphingolipid Ceramid als Second messenger eine Signalkaskade auslöst, welche letztendlich zur Apoptose der Zelle führt [90]. Lange wurde angenommen, dass der Schaden an den hSEZ selbst der Hauptgrund für den Funktionsverlust der Speicheldrüsen nach Bestrahlung sei. Nachdem erste Studien zeigten, dass die Schädigung von Endothelzellen bei den Strahlungseffekten auf andere Organe wie den Darm [91] oder das ZNS [92] eine wichtige Rolle spielten, wiesen Cotrim et al. im Mausmodell nach, dass bei der Speicheldrüse eine Korrelation zwischen dem Verlust mikrovaskulärer Endothelzellen und der zunehmenden Funktionseinschränkung besteht [50]. Einer Testgruppe wurden Gene der beiden für das Endothel essenziellen Wachstumsfaktoren Fibroblast growth factor (FGF) und Vascular endothelial growth factor (VEGF) vor Bestrahlung transfiziert, für die bereits in früheren Studien strahlenprotektive Effekte an anderen Organen nachgewiesen wurden. Hier zeigte sich, dass die Dichte der Endothelzellen in den transfizierten Speicheldrüsen nach Bestrahlung gegenüber der nicht-transfizierten Kontrollgruppe signifikant erhöht war und dass die Speichelflussraten verbessert werden konnte. Aufgrund dieser Daten zum Zusammenhang zwischen Drüsenepithelfunktion und intakten Endothelzellen sowie aufgrund der Tatsache, dass diese in der BioVaSc ebenfalls Verwendung finden, wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Monokultur auf der SIS-muc ebenfalls eine

Kokultur angelegt, bei der die mVEZ auf der serosalen Matrixseite einen planen Monolayer bildeten. Zur definitiven Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung gegen vWF, die eine gute Anfärbbarkeit über den gesamten Kulturzeitraum hinweg erbrachte.

Zellmorphologisch unterschied sich das Wachstum der hSEZ in 3D-Monokultur und -Kokultur mit mvEZ in der Übersichtsfärbung sowie in den rasterelektronenmikroskopischen Darstellungen nicht wesentlich voneinander. Bei beiden Ansätzen zeigten die hSEZ auf der mukosalen Matrixseite ein dichtes Wachstum mit Clusterbildung in den Matrixvertiefungen. In der Immunfluoreszenz-Färbung zeigten die untersuchten Marker α -Amylase, CL-1 und AQP-5 an beiden Messzeitpunkten (7 und 14 Tage Zellkulturdauer) in der Kokultur ein ähnliches Anfärbungsverhalten wie in der Monokultur. Lediglich bei CL-1 zeigte sich in der Kokultur zwischen Tag 7 und Tag 14 eine Zunahme der Anfärbung, die in der Monokultur so nicht nachzuweisen war. Kleinere Unterschiede im Anfärbungsverhalten könnten jedoch auch durch verschiedene Fehlereinflüsse bedingt sein: Zum einen repräsentiert der angefärbte histologische Schnitt nicht die komplette Zellkrone, zum anderen erfolgte die Kultur für die verschiedenen Messzeitpunkte auf unterschiedlichen Zell-Kronen. Darüber hinaus ließen sich im Rahmen der semiquantitativen Bildauswertung jedoch innerhalb der Mono- und Kokultur keine gravierenden Unterschiede in der Anfärbbarkeit oben genannter Marker feststellen.

Während sich die Zellmorphologie und die untersuchten Differenzierungsmerkmale in der 3D-Monokultur und -Kokultur stark ähnelten, ergab sich in der Bestimmung der Enzymaktivität in den aus den Zell-Kronen abgesaugten Überständen ein deutlicher Unterschied: Während in der 2D- und 3D-Monokultur nur eine sehr geringe über die 3 Versuche gemittelte Enzymaktivität von maximal $0,1 \text{ mU} \times \text{ml}^{-1}$ messbar war, lag diese bei der 3D-Kokultur zwischen $0,38 \text{ mU} \times \text{ml}^{-1}$ an Tag 9 und $0,82 \text{ mU} \times \text{ml}^{-1}$ an Tag 12 (vgl. hierzu Kapitel 3.4.4) und war somit bis zu 25 mal höher als in der 3D-Monokultur. Auch wenn diese Ergebnisse aufgrund hoher Abweichungen innerhalb der drei Versuche nicht an allen Messtagen statistisch signifikant waren, so zeigen sie doch den eindeutigen Trend, dass die Enzymaktivität der α -Amylase bei der Kokultur mit mvEZ gegenüber der

Monokultur deutlich erhöht war. Die genauen, dem zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen konnten im Rahmen dieser Studie nicht untersucht werden. Dennoch gibt es unterschiedliche, bereits beschriebene Interaktionen zwischen Endothelzellen und Epithelzellen, die hier eine Rolle spielen könnten: Zum einen gibt es Hinweise, dass Endothelzellen die azinäre Differenzierung humaner Speicheldrüselepipithelzellen innerhalb der Organogenese fördern, zum anderen ist es bekannt, dass Parenchymzellen, zu denen neben Fibroblasten auch Endothelzellen gehören, die Expression des entsprechenden Gens induzieren können [93, 94].

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss außerdem berücksichtigt werden, dass im hier durchgeführten Test nur die Enzymmenge mit in die Messung einbezogen wurde, die ohne jegliche Stimulation über einen definierten Zeitraum von den Zellen in das umgebende Medium abgegeben wurde. Eine Evaluierung der Aktivität der nach Stimulation durch β -Adrenoagonisten wie Isoproterenol (ISP) sekretierten α -Amylase [95] erfolgte nicht und sollte gegebenenfalls in zukünftige Studien implementiert werden.

Die gemittelten Werte der α -Amylase-Genexpression lagen in der 3D-Monokultur an beiden Messtagen höher als in der 3D-Kokultur. Der bei der Enzymaktivitätsmessung beschriebene Trend einer höheren α -Amylase-Aktivität in der 3D-Kokultur im Gegensatz zur 2D- und 3D-Monokultur spiegelte sich somit in der Analyse der Genexpression nicht wieder. Es ist jedoch bekannt, dass die Korrelation zwischen gemessener mRNA-Expression und der Proteinexpression häufig sehr gering ist. Mögliche Ursachen hierfür liegen in der Regulation der Protein-Expression nach Transkription bzw. Translation, beispielweise durch miRNA, RNA-Abbau oder posttranslationale Proteinmodifikation [96-98].

Hinsichtlich einer möglichen klinischen Translation unter der Verwendung der in dieser Arbeit eingesetzten mvEZ muss diskutiert werden, dass diese aus juvenilen Präputien gewonnen wurden, also bezogen auf den Spender der hSEZ xenogenen Ursprungs waren. Da die Transplantation xenogener Zellverbände bzw. Gewebe zu immunologischen Abstoßungsreaktionen führen kann, müsste hier eine alternative Zellgewinnung eruiert bzw. -im Falle einer tatsächlichen Organtransplantation unter

Verwendung dieser Zellen- eine immunsuppressive Therapie in Kauf genommen werden. Einen möglichen Ausweg böten hier Endothelzellen, die aus autologen ipS gewonnen werden und für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie neben der Beibehaltung physiologischer Differenzierungsmarker wie CD31 auch zur Bildung von Mikrogefäßen befähigt sind [99].

4.4 SIS-muc und BioVaSc als Matrices für das Tissue-Engineering der menschlichen Speicheldrüse

Matrices, die im Tissue-Engineering Verwendung finden, müssen definierte Kriterien erfüllen, die sie für den späteren klinischen Einsatz qualifizieren. Eine Bedingung stellt die Biokompatibilität der Matrix mit den für das Tissue Engineering des Gewebes erforderlichen Primärzellen dar. Sie lässt sich anhand verschiedener Parameter wie der Wachstumsmorphologie oder Differenzierung bewerten. Die Beurteilung dieser Zell-Matrix-Kompatibilität ist ein primäres Ziel dieser Arbeit. Soll die Matrix später als Gewebs- oder Organtransplantat im Patienten zum Einsatz kommen, müssen jedoch weitere Voraussetzungen erfüllt sein: Die Matrix muss auch mit dem Patientengewebe biokompatibel und nach Aufbau der finalen Gewebsstruktur *in vivo* biologisch abbaubar sein. Beim Tissue-Engineering der Speicheldrüse sind bereits verschiedene Matrices in Studien auf ihre Eignung hin untersucht worden, wobei hier zwischen synthetischen und biologisch gewonnenen Materialien unterschieden werden muss. Mit Matrigel konnte zwar *in vitro* eine gegenüber der konventionellen 2D-Plastik-Kultur bessere Differenzierung azinärer Marker wie α -Amylase und AQP-5 und eine verstärkte Enzymsekretion gezeigt werden [59]. Diese Matrix ist jedoch -wie bereits einleitend ausgeführt- aufgrund ihres Ursprungs aus Maussarkomen nicht biokompatibel für den potentiellen klinischen Einsatz *in vivo*. Andere, synthetische Biomatrices wie Polyurethan wären zwar biokompatibel, zeigten jedoch *in vitro* Probleme wie den Verlust zellulärer Differenzierungsmerkmale [100].

SIS-muc und BioVaSc sind biologische Matrices porzinen Ursprungs. Die SIS-muc besteht im Gegensatz zur SIS nicht nur aus dezellularisierter Submukosa, sondern schließt die darüberliegende Mukosa mit ein. Ein Vorteil des Ansatzes, bestehende Organ- oder Gewebsstrukturen zu dezellularisieren, ist die Tatsache, dass hierdurch eine von den

Spendertier-Zellen befreite, physiologisch konfigurierte Extrazellulärmatrix mit Basallaminakomponenten erhalten bleibt, die nicht erst durch die Zellen, mit denen die Matrix besiedelt wird, generiert werden muss. Hierdurch weist die SIS eine gute Biokompatibilität auf, die Zellmigration- und differenzierung ermöglicht [61, 62]. Außerdem ist die verbleibende Extrazellulärmatrix komplett biologisch abbaubar [63]. Die Eignung der Matrix für das Tissue-Engineering konnte in verschiedenen präklinischen Ansätzen belegt, die erfolgreiche klinische Translation in ersten Studien bestätigt werden [101-106].

In der vorliegenden Arbeit [107] diente die SIS-muc als statisches 3D-Testsystem, um die Zell-Matrix-Kompatibilität bewerten und bei zufriedenstellenden Ergebnissen in einer Folgestudie die hSEZ-Kultur in ein auf der BioVaSc-Matrix basierendes Bioreaktorsystem überführen zu können. Die BioVaSc wird – wie die SIS-muc- durch die Dezellularisierung porziner Dünndarmabschnitte gewonnen [69, 108]. Der Hauptunterschied liegt darin begründet, dass bei der Generierung der BioVaSc ein komplettes Darmsegment inklusive des adhären, versorgenden Gefäßstils entnommen wird und in seiner Integrität erhalten bleibt. Bei der SIS-muc hingegen erfolgt nach dessen Dezellularisierung die Portionierung in kleine Abschnitte und die Entfernung der adhären Gefäßanteile [64] – die Wachstumsoberfläche der beiden Matrices für die Zellen ist somit identisch. Bei der Dezellularisierung der BioVaSc werden nicht nur der Darmabschnitt selbst, sondern auch die adhären Gefäße durch kontinuierliche Perfusion erfasst. Später wird das Gefäßsystem mit mvEZ re-endothelialisiert, um es für die Perfusion im Bioreaktor nutzen zu können. Schließlich erfolgt die Besiedelung des BioVaSc-Lumens mit den Zielzellen und die Kultivierung im Bioreaktorsystem, bei dem die Zellen sowohl durch Fluss des Kulturmediums durch das Matrixlumen selbst, als auch durch die Perfusion des re-endothelialisierten Gefäßbündels versorgt werden [109]. Diese intakte vaskuläre Versorgung der besiedelten Matrix ist das entscheidende Merkmal, durch das sich die BioVaSc von der SIS-muc unterscheidet. Zwar konnte die *in vitro*-Generierung von funktionell intakten Speicheldrüsen-Konstrukten und deren nachfolgende Implantation ohne *in vitro*-Vaskularisierung im Mausmodell demonstriert werden [33] – doch dies gelang nur aufgrund der geringen Größe der murinen

Konstrukte. Die maximale, über Diffusion suffizient zu versorgende Gewebsgröße beträgt *in vitro* nur ca. 100-200 μm [110], bei größeren Scaffolds würde es somit ohne intrinsische Vaskularisierung zur Zellnekrose im Zentrum kommen. Für die Gewährleistung einer suffizienten Organfunktion in der klinischen Anwendung wären jedoch weit größere Speicheldrüsen-Autotransplantate notwendig, weswegen die Vaskularisierung der BioVaSc für die dieser Arbeit folgenden Versuche eine herausragende Rolle spielen wird. Es konnte gezeigt werden, dass die dynamische Kultur in der BioVaSc der statischen hinsichtlich der Zellmorphologie und der Ausprägung zellspezifischer Marker überlegen ist und dass auf Grundlage der BioVaSc Gewebstransplantate mit *in vivo* funktionaler Vaskularisierung generiert werden können [111]. Hier muss jedoch eingeschränkt werden, dass *in vivo* Langzeit-Daten zu BioVaSc-basierten Transplantaten bisher kaum verfügbar sind bzw. -wenn vorhanden- auf Pilotstudien wie der Transplantation eines Trachealpatches bei einzelnen Patienten basieren [112]. Im Gegensatz zu dieser Studie, in der die Versorgung des Transplantats über Diffusion ausreichend war, müsste bei der Transplantation einer mit hSEZ besiedelten BioVaSc eine mikrochirurgische Anastomosierung der adhärennten Transplantat-Gefäße mit angrenzenden Gefäßästen erfolgen, wobei die Möglichkeit einer Anastomosenthrombose ein zusätzliches Risiko für das Transplantat darstellen würde. Daher müsste aller Wahrscheinlichkeit nach- wie in oben genannter Machbarkeitsstudie, in der eine solche Anastomose an der A. brachialis erfolgte – eine gerinnungshemmende Medikation erfolgen [111]. Neben der Nutzung eines präexistenten Gefäßnetzes durch Dezellularisierung bestehender Gewebe wie im Fall der BioVaSc existieren auch andere Ansätze, um Bedingungen für eine suffiziente Vaskularisierung zu etablieren. Exemplarisch sei hier auf die Generierung von Gewebskonstrukten mit prävasculären Strukturen durch spezielle Zellschichtung und Co-Kultur von Endothelzellen mit Fibroblasten verwiesen [113].

Neben einer suffizienten Vaskularisierung stellt -wie in Kapitel 1.1 ausgeführt- auch die Innervation eine wichtige Komponente für die Funktionalität von Speicheldrüsen dar. Es ist bekannt, dass eine intakte parasymphatische Innervation eine wichtige Rolle für die durch epitheliale Progenitorzellen vermittelte Regenerationsfähigkeit von

Speicheldrüsengewebe spielt [114, 115] und dass eine β -adrenerge Stimulierung der Speicheldrüse für die induzierte Speichelsekretion *in vitro* wie *in vivo* nötig ist [95]. Somit erscheint es möglich, dass eine fehlende Innervation in Hinblick auf die klinische Translation eine funktionelle Limitation darstellen könnte. Zwar ist für die Autotransplantation der Glandula submandibularis als Tränendrüsenersatz eine spontane Reinnervation mit konsekutiv sukzessive steigender Sekretion beschrieben [116]; ob dies jedoch im Falle eines Speicheldrüsenersatzes durch die mit hSEZ besiedelte BioVaSc zu erwarten wäre, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Um sich diesen und den weiteren, für die klinische Translation relevanten Fragestellungen annähern zu können, erscheint die Transformation der hSEZ-Kultur ins dynamische Modell der BioVaSc essentiell.

5. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass auf der SIS-muc kultivierte, humane Speicheldrüsenepithelzellen (hSEZ) funktionell-strukturelle Merkmale aufweisen, die diese Matrix, bzw. deren vaskularisierte Variante, die BioVaSc, für das Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse qualifizieren. Dennoch trennen die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchungen und den potentiellen klinischen Einsatz einer mit autologen hSEZ besiedelten BioVaSc-Matrix noch zahlreiche Tests und Unwägbarkeiten. Zwar ist anzunehmen, dass aufgrund der bestehenden Vaskularisierung der BioVaSc die Kulturbedingungen für die Zellen noch einmal verbessert werden können. Ob jedoch eine solche, im Bioreaktorsystem besiedelte Matrix die für einen erfolgreichen klinischen Einsatz nötige Menge an Speichel produzieren kann und in wieweit der so produzierte Speichel an die physiologische Zusammensetzung menschlichen Speichels heranreicht, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht eruiert werden. Die möglichen Probleme einer fehlenden Innervation im Sinne eines Ausfalls der induzierten Speichelsekretion wurden diskutiert; diesbezüglich bleibt zu erwähnen, dass verschiedene Autotransplantations-Studien, bei denen eine Denervierung der Speicheldrüsen erfolgte, eine suffiziente Speichelproduktion in Folge einer angehobenen basalen Speichelproduktion [31, 117]

zeigen konnten. Ob auch bei durch Tissue Engineering erstellten Speicheldrüsentransplantaten die Basalsekretion *in vivo* erhöht wäre, ist jedoch ungewiss. Die bei der 3D-Kokultur gegenüber der 2D-Kultur deutlich erhöhte, nicht-stimulierte α -Amylase-Produktion kann zumindest als ein erster positiver Prädiktor für einen solchen, potentiell auf basale Sekretion angewiesenen Organersatz gewertet werden. Die beschriebenen Vorteile eines auf Tissue Engineering basierenden Autotransplantats und die Ergebnisse dieser Arbeit gebieten es, in kommenden Studien die dynamische 3D-Kultur humaner Speicheldrüsenepithelzellen im BioVaSc-Modell zu untersuchen, um den nächsten Schritt hin zu einer echten Therapieoption für Patienten mit Xerostomie zu gehen.

6. Literaturverzeichnis

1. Navazesh, M. and C.M. Christensen, *A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures*. J Dent Res, 1982. **61**(10): p. 1158-62.
2. Proctor, G.B. and G.H. Carpenter, *Salivary secretion: mechanism and neural regulation*. Monogr Oral Sci, 2014. **24**: p. 14-29.
3. Pedersen, A.M., et al., *Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion*. Oral Dis, 2002. **8**(3): p. 117-29.
4. Schupbach, P., et al., *Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro*. Eur J Oral Sci, 2001. **109**(1): p. 60-8.
5. Ramirez-Amador, V., et al., *Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1997. **84**(2): p. 149-53.
6. Keene, H.J., et al., *Dental caries and Streptococcus mutans prevalence in cancer patients with irradiation-induced xerostomia: 1-13 years after radiotherapy*. Caries Res, 1981. **15**(5): p. 416-27.
7. Pinna, R., et al., *Xerostomia induced by radiotherapy: an overview of the physiopathology, clinical evidence, and management of the oral damage*. Ther Clin Risk Manag, 2015. **11**: p. 171-88.
8. Herrmann, G., et al., *[Xerostomia and its impact on oral health-related quality of life]*. Z Gerontol Geriatr, 2017. **50**(2): p. 145-150.
9. Porter, S.R., C. Scully, and A.M. Hegarty, *An update of the etiology and management of xerostomia*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **97**(1): p. 28-46.
10. Conway, D.I., et al., *Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium*. Oral Oncol, 2009. **45**(9): p. 743-6.

11. Fitzmaurice, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*. JAMA Oncol, 2017. **3**(4): p. 524-548.
12. Barnes, B., et al., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*: p. 57-60.
13. Vigneswaran, N. and M.D. Williams, *Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis*. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2014. **26**(2): p. 123-41.
14. Belcher, R., et al., *Current treatment of head and neck squamous cell cancer*. J Surg Oncol, 2014. **110**(5): p. 551-74.
15. Blanco, A.I., et al., *Dose-volume modeling of salivary function in patients with head-and-neck cancer receiving radiotherapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **62**(4): p. 1055-69.
16. Aliko, A., et al., *World Workshop on Oral Medicine VI: clinical implications of medication-induced salivary gland dysfunction*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2015. **120**(2): p. 185-206.
17. Hansen, A., P.E. Lipsky, and T. Dorner, *New concepts in the pathogenesis of Sjogren syndrome: many questions, fewer answers*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15**(5): p. 563-70.
18. Nutting, C.M., et al., *Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2011. **12**(2): p. 127-36.
19. Parliament, M.B., et al., *Preservation of oral health-related quality of life and salivary flow rates after inverse-planned intensity- modulated radiotherapy (IMRT) for head-and-neck cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 663-73.
20. Brizel, D.M., et al., *Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer*. J Clin Oncol, 2000. **18**(19): p. 3339-45.
21. Veerasarn, V., et al., *Effect of Amifostine to prevent radiotherapy-induced acute and late toxicity in head and neck cancer patients who had normal or mild impaired salivary gland function*. J Med Assoc Thai, 2006. **89**(12): p. 2056-67.
22. Buentzel, J., et al., *Intravenous amifostine during chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: a randomized placebo-controlled phase III study*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **64**(3): p. 684-91.
23. Jellema, A.P., et al., *Radiotherapy alone, versus radiotherapy with amifostine 3 times weekly, versus radiotherapy with amifostine 5 times weekly: A prospective randomized study in squamous cell head and neck cancer*. Cancer, 2006. **107**(3): p. 544-53.
24. Koukourakis, M.I., *Amifostine: is there evidence of tumor protection?* Semin Oncol, 2003. **30**(6): p. 18-30.
25. Gu, J., et al., *Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e95968.
26. Rades, D., et al., *Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients*. Radiother Oncol, 2004. **70**(3): p. 261-4.

27. Johnson, J.T., et al., *Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer*. N Engl J Med, 1993. **329**(6): p. 390-5.
28. LeVeque, F.G., et al., *A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration study of oral pilocarpine for treatment of radiation-induced xerostomia in head and neck cancer patients*. J Clin Oncol, 1993. **11**(6): p. 1124-31.
29. Fox, P.C., *Salivary enhancement therapies*. Caries Res, 2004. **38**(3): p. 241-6.
30. Fisher, J., et al., *Phase III quality-of-life study results: impact on patients' quality of life to reducing xerostomia after radiotherapy for head-and-neck cancer--RTOG 97-09*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **56**(3): p. 832-6.
31. Hagen, R., et al., *Two-stage autotransplantation of human submandibular gland: a novel approach to treat postradiogenic xerostomia*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2016. **273**(8): p. 2217-22.
32. Wong, R.K., et al., *A Phase I-II study in the use of acupuncture-like transcutaneous nerve stimulation in the treatment of radiation-induced xerostomia in head-and-neck cancer patients treated with radical radiotherapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **57**(2): p. 472-80.
33. Ogawa, M., et al., *Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2498.
34. Kojima, T., et al., *Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells*. Laryngoscope, 2011. **121**(9): p. 1864-9.
35. Lim, J.Y., et al., *Intraglandular transplantation of bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells for amelioration of post-irradiation salivary gland damage*. Oral Oncol, 2013. **49**(2): p. 136-43.
36. Lin, C.Y., et al., *Cell therapy for salivary gland regeneration*. J Dent Res, 2011. **90**(3): p. 341-6.
37. Xu, J., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome*. Blood, 2012. **120**(15): p. 3142-51.
38. Khalili, S., et al., *Mesenchymal stromal cells improve salivary function and reduce lymphocytic infiltrates in mice with Sjogren's-like disease*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38615.
39. Lombaert, I.M., et al., *Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1804-12.
40. Lombaert, I.M., et al., *Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2063.
41. Sumita, Y., et al., *Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(1): p. 80-7.
42. Xu, Q.L., et al., *Induction of Salivary Gland-Like Cells from Dental Follicle Epithelial Cells*. J Dent Res, 2017. **96**(9): p. 1035-1043.
43. Ono, H., et al., *Regenerating Salivary Glands in the Microenvironment of Induced Pluripotent Stem Cells*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 293570.
44. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.

45. Sundelacruz, S. and D.L. Kaplan, *Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(6): p. 646-55.
46. Howard, D., et al., *Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds*. J Anat, 2008. **213**(1): p. 66-72.
47. Delporte, C., et al., *Safety of salivary gland-administered replication-deficient recombinant adenovirus in rats*. J Oral Pathol Med, 1998. **27**(1): p. 34-8.
48. Agre, P., et al., *Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel*. Am J Physiol, 1993. **265**(4 Pt 2): p. F463-76.
49. Agre, P., et al., *Human red cell Aquaporin CHIP. II. Expression during normal fetal development and in a novel form of congenital dyserythropoietic anemia*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1050-8.
50. Cotrim, A.P., et al., *Prevention of irradiation-induced salivary hypofunction by microvessel protection in mouse salivary glands*. Mol Ther, 2007. **15**(12): p. 2101-6.
51. Nabel, G.J., *Development of optimized vectors for gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 324-6.
52. Levitt, M., *Could the organ shortage ever be met?* Life Sci Soc Policy, 2015. **11**: p. 6.
53. Stock, U.A. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: current state and prospects*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 443-51.
54. Steinke, M., et al., *An engineered 3D human airway mucosa model based on an SIS scaffold*. Biomaterials, 2014. **35**(26): p. 7355-62.
55. Stratmann, A.T., et al., *Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model*. Mol Oncol, 2014. **8**(2): p. 351-65.
56. Dardick, I., et al., *Pathobiology of salivary glands. IV. Histogenetic concepts and cycling cells in human parotid and submandibular glands cultured in floating collagen gels*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1993. **76**(3): p. 307-18.
57. Bucheler, M., et al., *Tissue engineering of human salivary gland organoids*. Acta Otolaryngol, 2002. **122**(5): p. 541-5.
58. Joraku, A., et al., *Tissue engineering of functional salivary gland tissue*. Laryngoscope, 2005. **115**(2): p. 244-8.
59. Maria, O.M., et al., *Matrigel improves functional properties of primary human salivary gland cells*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(9-10): p. 1229-38.
60. Nam, K., et al., *L1 Peptide-Conjugated Fibrin Hydrogels Promote Salivary Gland Regeneration*. J Dent Res, 2017. **96**(7): p. 798-806.
61. Badylak, S., et al., *Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S333-43.
62. Voytik-Harbin, S.L., et al., *Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa*. J Cell Biochem, 1997. **67**(4): p. 478-91.
63. Hodde, J., *Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration*. Tissue Eng, 2002. **8**(2): p. 295-308.
64. Moll, C., et al., *Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system*. J Vis Exp, 2013(78): p. e50460.

65. Duval, K., et al., *Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(4): p. 266-277.
66. Gmunder, F.K., et al., *Dynamic cell culture system: a new cell cultivation instrument for biological experiments in space*. J Biotechnol, 1988. **7**: p. 217-28.
67. Davison, P.M., K. Bensch, and M.A. Karasek, *Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture*. J Invest Dermatol, 1980. **75**(4): p. 316-21.
68. Polgar, L., *The catalytic triad of serine peptidases*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(19-20): p. 2161-72.
69. Mertsching, H., et al., *Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6610-7.
70. Pusch, J., et al., *The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine*. Biomaterials, 2011. **32**(30): p. 7469-78.
71. Cardiff, R.D., C.H. Miller, and R.J. Munn, *Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections*. Cold Spring Harb Protoc, 2014. **2014**(6): p. 655-8.
72. Odell, I. and D. Cook, *Immunofluorescence techniques*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. e4.
73. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1211-3.
74. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
75. Maria, O.M., et al., *Distribution of tight junction proteins in adult human salivary glands*. J Histochem Cytochem, 2008. **56**(12): p. 1093-8.
76. Azevedo, R.S., et al., *Comparative cytokeratin expression in the different cell types of salivary gland mucoepidermoid carcinoma*. Head Neck Pathol, 2008. **2**(4): p. 257-64.
77. Aguirre, A., et al., *Immunochemical quantitation of alpha-amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages*. Arch Oral Biol, 1987. **32**(4): p. 297-301.
78. Lee, M.D., et al., *The human Aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8599-604.
79. Ma, T., et al., *Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20071-4.
80. Korsrud, F.R. and P. Brandtzaeg, *Characterization of epithelial elements in human major salivary glands by functional markers: localization of amylase, lactoferrin, lysozyme, secretory component, and secretory immunoglobulins by paired immunofluorescence staining*. J Histochem Cytochem, 1982. **30**(7): p. 657-66.
81. Ishikawa, Y. and H. Ishida, *Aquaporin water channel in salivary glands*. Jpn J Pharmacol, 2000. **83**(2): p. 95-101.
82. Chan, Y.H., et al., *Human salivary gland acinar cells spontaneously form three-dimensional structures and change the protein expression patterns*. J Cell Physiol, 2011. **226**(11): p. 3076-85.

83. Szlavik, V., et al., *Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(11): p. 1915-26.
84. Delporte, C. and S. Steinfeld, *Distribution and roles of aquaporins in salivary glands*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(8): p. 1061-70.
85. Wells, K.L. and N. Patel, *Lumen formation in salivary gland development*. Front Oral Biol, 2010. **14**: p. 78-89.
86. Pradhan, S., et al., *Lumen formation in three-dimensional cultures of salivary acinar cells*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. **142**(2): p. 191-5.
87. Tilley, S., et al., *Taking tissue-engineering principles into theater: augmentation of impacted allograft with human bone marrow stromal cells*. Regen Med, 2006. **1**(5): p. 685-92.
88. Nguyen, D., et al., *Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 658.
89. Fei, P. and W.S. El-Deiry, *P53 and radiation responses*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5774-83.
90. Kolesnick, R. and Z. Fuks, *Radiation and ceramide-induced apoptosis*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5897-906.
91. Paris, F., et al., *Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice*. Science, 2001. **293**(5528): p. 293-7.
92. Pena, L.A., Z. Fuks, and R.N. Kolesnick, *Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 321-7.
93. Kwon, H.R., et al., *Endothelial cell regulation of salivary gland epithelial patterning*. Development, 2017. **144**(2): p. 211-220.
94. Chou, Y.S., et al., *Effects of fibroblasts on the function of acinar cells from the same human parotid gland*. Head Neck, 2016. **38**: p. 279-86.
95. Chopra, D.P. and I.C. Xue-Hu, *Secretion of alpha-amylase in human parotid gland epithelial cell culture*. J Cell Physiol, 1993. **155**(2): p. 223-33.
96. Schwanhausser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-42.
97. de Sousa Abreu, R., et al., *Global signatures of protein and mRNA expression levels*. Mol Biosyst, 2009. **5**(12): p. 1512-26.
98. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 227-32.
99. Kurokawa, Y.K., et al., *Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells for Three-Dimensional Microphysiological Systems*. Tissue Eng Part C Methods, 2017. **23**(8): p. 474-484.
100. Grad, S., et al., *The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations*. Biomaterials, 2003. **24**(28): p. 5163-71.
101. Lantz, G.C., et al., *Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review*. J Invest Surg, 1993. **6**(3): p. 297-310.

102. Record, R.D., et al., *In vivo degradation of ¹⁴C-labeled small intestinal submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair*. *Biomaterials*, 2001. **22**(19): p. 2653-9.
103. Musahl, V., et al., *The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament--a functional tissue engineering study in rabbits*. *J Orthop Res*, 2004. **22**(1): p. 214-20.
104. Nie, X., et al., *Comparison of Porcine Small Intestinal Submucosa versus Polypropylene in Open Inguinal Hernia Repair: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0135073.
105. Kremer, A., et al., *Three-Dimensional Coculture of Meniscal Cells and Mesenchymal Stem Cells in Collagen Type I Hydrogel on a Small Intestinal Matrix-A Pilot Study Toward Equine Meniscus Tissue Engineering*. *Tissue Eng Part A*, 2017. **23**(9-10): p. 390-402.
106. Lin, C.H., et al., *Auricular Tissue Engineering Using Osteogenic Differentiation of Adipose Stem Cells with Small Intestine Submucosa*. *Plast Reconstr Surg*, 2017. **140**(2): p. 297-305.
107. Burghartz, M., et al., *Development of Human Salivary Gland-Like Tissue In Vitro*. *Tissue Eng Part A*, 2018. **24**(3-4): p. 301-309.
108. Schultheiss, D., et al., *Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model*. *J Urol*, 2005. **173**(1): p. 276-80.
109. Schanz, J., et al., *Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research*. *J Biotechnol*, 2010. **148**(1): p. 56-63.
110. Lovett, M., et al., *Vascularization strategies for tissue engineering*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009. **15**(3): p. 353-70.
111. Mertsching, H., et al., *Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue*. *Transplantation*, 2009. **88**(2): p. 203-10.
112. Steinke, M., et al., *Host-integration of a tissue-engineered airway patch: two-year follow-up in a single patient*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(3-4): p. 573-9.
113. Asakawa, N., et al., *Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering*. *Biomaterials*, 2010. **31**(14): p. 3903-9.
114. Knox, S.M., et al., *Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 1494.
115. Knox, S.M., et al., *Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis*. *Science*, 2010. **329**(5999): p. 1645-7.
116. Geerling, G., et al., *Innervation and secretory function of transplanted human submandibular salivary glands*. *Transplantation*, 2008. **85**(1): p. 135-40.
117. Geerling, G., et al., *Transplantation of the autologous submandibular gland for most severe cases of keratoconjunctivitis sicca*. *Ophthalmology*, 1998. **105**(2): p. 327-35.

7. Anhang

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Tab. 16: Geräte.

Gerät	Hersteller
Abzughaube	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfel (AUT)
Accu-jet®pro, Pipettierhilfe	Accu-jet®, Brand, Wertheim (D)
Autoklav	
1) Technoclav	Biomedis, Giessen (D)
2) DX-45 Tischaufoklav	Systec, Wettenberg (D)
3) Dampfautoklav „Varioklav“	H+P, Hackermos (D)
Autoklav, Dampfsterilisation	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg (D)
Dampfbad „Multi-Gourmet“	Braun, Kronberg (GER)
Digitalkamera D90	Nikon, Tokio (J)
Einbettautomat	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (D)
Eismaschine AF-80	Scotsman, Mailand (I)
Entsorgungssystem Septophag	Hesse, Emmerich (D)
Exsikkator	Novus NS-Tubus, Duran Group Mainz (D)
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg (D)
Gefrierschrank -20° C	Liebherr, Biberach a.d. Riss (D)
Gefrierschrank -80° C	Heraeus Med, Hanau (D)
Gefrierschrank -80° C	Thermo Fisher Scientific, Waltham (D)
Gelelektrophoresekammer PerfectBlue Twin S	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
Kritisch-Punkt-Trockner CPD 030	BAL-TEC AG, Balzers (LIE)

Kryotom, Leica CM1510S	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Kühlplatte	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Kühlraum 4°C	Genheimer, Höchberg (D)
Kühlschrank FKS 5000	Liebherr, Biberach an der Riß (D)
Lichtmikroskop 473028	Zeiss, Oberkochen (D)
Mikroplattenleser Infinite M200	Tecan Deutschland, Crailsheim (D)
Mikrotom RM 2255	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Mikrowelle NN-E205W	Panasonic, Hamburg (D)
Neubauerzählkammer	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Objektträgerdrucker	Vogel Medizintechnik, Giessen (GER)
Paraffin-Einbettautomat Mikrom STP120	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (D)
Paraffinspender	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Paraffinstreckbad GFL 1052	Medax, Kiel (D)
PCR Thermocycler, Sensoquest	Biorad Laboratories, München (D)
Peristaltik-Pumpsystem	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Rasterelektronenmikroskop JSM 7500F	Jeol, Freising (D)
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach (D)
Schlittenmikrotom RM 2255	Leica, Wetzlar (D)
Schüttler IKA-Vibrax-VXR elektronik	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Thermo Electron LED, Langenselbold (D)
Sicherheitswerkbank NU-425-600 E	Nuaire, Plymouth (USA)
Spannungsgenerator EV202, EV243	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
Sputter-Beschichtungsvorrichtung SCD 005	BAL-TEC AG, Balzers (LIE)
Thermostat	Eppendorf AG, Hamburg (D)

TissueLyser	Quiagen, Hilden (D)
Transmissionselektronenmikroskop JEM 2100	Jeol, Freising (D)
Trockenschrank	Memmert, Schwabach (D)
UV-Kammer: Transilluminator	Vilber Lourmat, Eberhardzell (D)
VacuBoy Absaughilfe	Integra Biosciences, Fernwald (GER)
Vortexer „Genie 2“	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Waage (Analysenwaage+ Präzipitationswaage)	Kern und Sohn, Balingen-Frommern (D)
Wasserbad Julabo U37A	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Wippschüttler	neoLab, Heidelberg (D)
Zellinkubator BBD 6220: 37 °C, 5 % CO ₂	Heraeus, Hanau (D)
Zentrifugen Zentrifuge 5417R Zentrifuge Pico 17 Rotilabo	Eppendorf, Hamburg (D) Thermo Fisher Scientific, Dreieich (D) Carl Roth, Karlsruhe (D)

7.1.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 17: Verbrauchsmaterial.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Braunüle Vasofix, G20	B.Braun, Melsungen (D)
Deckgläser (24x50 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen (D)
Deckgläser (24x60 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Einbettfilterpapier	Labonord, Mönchengladbach (D)
Einbettkassetten	Klinipath, Duiven (Niederlande)
Einmal-Entsorgungsbeutel	A. Hartenstein, Würzburg (D)

Einmalpipetten (5/10/25/50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Fettstift „Dako Pen“	Dako, Hamburg (D)
Filterpapier	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Handschuhe 1) Latex 2) Nitril	Cardinal Health, Kleve (D) Kimberly-Clark, Koblenz (D)
Kryoeinbettformen 10 mm ³)	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude (NL)
Mikrotiterplatte 96-Well schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Mikrotom Einmalklingen, Typ S35	Pfm medical, Köln (D)
Objektträger Polysine (25x75x1 mm)	Langenbrinck, Emmendingen (D)
Objektträger Superfrost Plus (25x75x1 mm)	Langenbrinck, Emmendingen (D)
Papiertuch	IGEFA, Ahrensfelde (D)
PAP-Pen	Science Services, München (D)
Parafilm®	Sigma-Aldrich, München (D)
Pasteurpipetten (230 mm)	Brand, Wertheim (D)
Petrischalen (94x16 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen (0,5-10/10-100/100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Skalpellklingen, rund	Bayha, Tuttlingen (D)
Waagschale	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Zellkulturflaschen (25/75/150 cm ²)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (CH)

Zellkulturplatte mit 12/24/96 Wells	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (CH)
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)

7.1.3 Labormaterial

Tab. 18: Labormaterial.

Labormaterial	Hersteller
Drahtsieb (Specimen baskets)	BAL-TEC AG, Balzers (LIE)
Edelstahl-Paraffin-Gießformen (24x37x9mm)	Labonord, Mönchengladbach (D)
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml/2 ml)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Eppendorf-Gefäßständer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Färbesystem 1) Glasküvette mit Deckel (110x90x80 mm) 2) Färberahmen aus Glas (90x70x50 mm) 3) Drahtbügel aus Edelstahl	Mercateo, München (D)
Gelkamm	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
Kälteschutzhandschuhe	VWR, Darmstadt (D)
Gelkammer	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
Gelschlitten	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
Halterungsgestell für Eppendorf- Reaktionsgefäße	neoLab, Heidelberg (D)
Glasflaschen (50, 100, 250, 1000 ml)	Schott, Mainz (D)
Glaspipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Brand, Wertheim (D)
Glaswaren	Schott AG, Mainz (D)
Handzähler	neoLab, Heidelberg (D)

Pinzetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim (D)
Scheren	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim (D)
Spatel	VWR, Darmstadt (D)
Löffelspatel	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Trichter	A. Hartenstein, Würzburg (D)
PCR-Gefäßständer	A. Hartenstein, Würzburg (D)
PCR-Tubes	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Pipetten: 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettierhilfe Pipet-Boy	Brand, Wernheim (D)
Quatriperm-Schale	Nalge Nunc International, New York (USA)
Probenhalter für REM	Plano GmbH, Wetzlar (D)
Zellkronen für statische 3D-Kultur	Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg (D)

7.1.4 Chemikalien und Lösungen

Tab. 19: Chemikalien und Lösungen.

Chemikalie/Lösung	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Aceton	Sigma-Aldrich, München (D)
Aqua (H ₂ O)	B.Braun, Melsungen (D)
BSA-Proteinstandard	Sigma-Aldrich, München (D)
Cacodylat	Carl Roth, Karlsruhe (D)
DAPI Fluoromount-G™	SouthernBiotech, Birmingham (USA)
Descosept	Seidel medipool, Reichertshofen (D)
Desoxycholsäure	Carl Roth, Karlsruhe (D)

Dispase-Lösung (2,0 U/ml)	Life technologies, Carlsbad (USA)
DNA-Ladepuffer Orange G 6x	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Donkey Serum	Life technologies, Carlsbad (USA)
Entellan	Merck, Darmstadt (D)
Epon 812	Serca, Eppelheim (D)
Ethanol 96%, vergällt	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ethidiumbromid 1%	A. Hartenstein, Würzburg (D)
FDA (Fluorescein Diacetat)	Sigma-Aldrich, München (D)
Fungizone (Amphotericin B, 250 µg/ml)	Life technologies, Carlsbad (USA)
Glutaraldehyd (6,25%, 2,5%)	Merck, Darmstadt (D)
Hämalaun	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Kochsalzlösung (0,9%)	B. Braun, Melsungen (D)
LE Agarosepulver	Biozym Scientific, Oldendorf (D)
Mastermix PCR	Bioline, Luckenwalde (D)
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich, München (D)
NaCl (Natriumchlorid, 0,9%)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Natriumphosphatpuffer (0,1M)	Merck, Darmstadt (D)
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Science Services, München (D)
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe (D)
PBS ⁻ -EDTA (0,04 %)-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Phosphate Buffered Saline (PBS ⁻) ohne Mg und Ca	Sigma-Aldrich, München (D)
Phosphate Buffered Saline (PBS ⁺)	Sigma-Aldrich, München (D)

mit Mg und Ca	
Propylenoxid	Sigma-Aldrich, München (D)
RNAlater®	Ambion, Austin, TX (USA)
RNase Exitus Plus	AppliChem, Darmstadt (D)
Taq-Polymerase	Bioline, Luckenwalde (D)
Tissue Tek®	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude (NL)
Triton X	Sigma-Aldrich, München (D)
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, München (D)
Trypsin (0,5%) 10x	Life technologies, Carlsbad (USA)
Trypsin-EDTA-Lösung (0.05%)	Life technologies, Carlsbad (USA)
Uranylacetat (0,5%)	Merck, Darmstadt (D)
Versene-Lösung	Life technologies, Carlsbad (USA)
VE-Wasser (demineralisiertes Wasser)	Universitätsklinikum Würzburg (D)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 3%)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Xylol	Sigma-Aldrich, München (D)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe (D)

7.1.5 Medien und Puffer

Tab. 20: Medien und Puffer.

Medien	Zusammensetzung	Hersteller
Airway epithelial cell medium (AECM)		PromoCell, Heidelberg (D)
Dezellularisierungslösung	45 g Desoxycholsäure gelöst in 2 l Reinstwasser	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Blocking-Lösung	0.3 % Triton X 5 % BSA 5 % Donkey Serum	Sigma-Aldrich, München (D) Sigma-Aldrich, München (D)

		Life technologies, Carlsbad (USA)
DNase I Lösung für RNA-Isolation	Tris-HCL, pH 7,5, 50 mM 1 mg/ml BSA	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
DNase-Lösung für Dezellularisierung der SIS-muc	100 mg gelöst in 300 ml PBS ⁺ + 1% PenStrep	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM-Pulver (+ Glucose 4500 mg/l) 13,38g/l NaHCO ₃ 3,7 g/l gelöst in ddH ₂ O pH 7,2	Life technologies, Carlsbad (USA)
Eosin	Eosin 10 mg/ml gelöst in VE-Wasser	Sigma-Aldrich, München (D)
Einbettlösung für Immunfluoreszenzfärbung	0,1 0.1µg/ml DAPI gelöst in Mowiol	Southern Biotech, Birmingham (USA) Sigma-Aldrich, München (D)
FDA-Ethidiumbromid-Färbelösung	2,5 ml PBS ⁻ 15 µl FDA-Lösung (5 mg FDA/ml Aceton) 30 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München (D) A. Hartenstein, Würzburg (D)
Fetales Kälberserum (FCS)		Linaris, Werthheim- Bettingen (D)
Hämalaun	Hämatoxylin 1,2g/l Natriumjodat 0,2 g/l Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat 20 g/l Chloralhydrat 20 g/l Zitronensäure 1g/l gelöst in VE- Wasser	Carl Roth, Karlsruhe (D)
HCl/EtOH (HE Färbung)	HCl, 1M, 6,85%	VWR, Darmstadt (D)

	in Ethanol (50%)	
Penicillin-Streptomycin für Zellkultur	1000 µg/ml	Biochrom, Berlin (D)
Penicillin-Streptomycin für Dezellularisierung der SIS-muc	5000 µg/ml	Life technologies, Carlsbad (CA)
PFA 4%	Paraformaldehyde 40 g/l in PBS ⁻ Lösung, pH 7,4	AppliChem, Darmstadt (D)
Sörensenpuffer	KH ₂ PO ₄ 100mM 20% + Na ₂ HPO ₄ 100mM 80%	AppliChem, Darmstadt (D)
TAE-Puffer	40 mM TRIS/Acetat pH 8.3 1 mM EDTA	Sigma-Aldrich, München (D)
VascuLife® Medium		CellSystems, Troisdorf (D)

7.1.6 Antikörper und Kits

Tab. 21: Verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
AQP-5	Kaninchen	1:100	Abcam, Milton (GB)
Claudin-1	Kaninchen	1:100	Life technologies, Carlsbad (CA)
Panzytokeratin	Maus	1:100	Sigma-Aldrich, München (D)
Panzytokeratin	Kaninchen	1:100	Abcam, Milton (GB)
vWF	Maus	1:100	Abcam, Milton (GB)
α-Amylase	Kaninchen	1:100	Sigma-Aldrich, München (D)

Tab. 22: Verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor®555 Goat Anti-Rabbit IgG	Ziege	1:400	Life technologies, Carlsbad (CA)
Alexa Fluor®647 Goat Anti-Mouse IgG	Ziege	1:400	Life technologies, Carlsbad (CA)

Tab. 23: Kits mit Reaktionsmischungen.

Kit	Hersteller
Amylase Assay kit (Colormetric) ab102523: <ul style="list-style-type: none"> • Amylase Assay Puffer • Amylase Positive Kontrolle • Amylase Substrat-Mix • Nitrophenol standard 	Abcam, Milton (GB)
iScript cDNA Synthese Kit: <ul style="list-style-type: none"> • iScript Reaktionsmischung • iScript Reverse Transkriptase • Nuklease freies H₂O 	Biorad Laboratories, München (D)
RNeasy Micro Kit: <ul style="list-style-type: none"> • RNeasy MinElute Spin-Säule • Sammelröhrchen (2 ml/1,5 ml) • RLT-Puffer • RW1-Puffer • RPE-Puffer • RDD-Puffer • RNase freies H₂O • Quiazol Lysis Reagenz 	Quiagen, Hilden (D)
QIAshredder	Qiagen, Hilden (D)

7.1.7 PCR-Material

Tab. 24: Primer & PCR-Reagenzien.

Primer	Hersteller
α -Amylase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
Zytokeratin 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
EF1 α	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
GAPDH	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
TaqMan® Universal PCR Master Mix <ul style="list-style-type: none"> • AmpliTaq Gold® DNA Polymerase • Uracil-N Glykosylase (UNG) • dNTPs/dUTP • ROX™ Passiv-Referenz • Pufferkomponenten 	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)

7.1.8 Gewebe und Zellen

Tabelle 25 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärzellen. Die Isolationsverfahren werden in Kapitel 2.1 behandelt.

Tab. 25: Zelltypen.

Zelltyp	Spenderalter	Spendergeschlecht	Zellpassage
hSEZ	24	weiblich	3
	65	männlich	3
	32	weiblich	3
mvEZ	juvenil	männlich	2

Humane Speicheldrüsenepithelzellen (hSEZ)

Die humanen Speicheldrüsenepithelzellen (hSEZ) wurden aus Biopsaten von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenkrankheiten, plastische und

ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg isoliert. Diese wurden im Rahmen der operativen Entfernung benigner Speicheldrüsentumore entnommen.

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEZ)

Die mikrovaskulären Endothelzellen (mvEZ) stammen aus Hautbiopsaten von Patienten des Kreiskrankenhauses Ludwigsburg sowie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg.

7.1.9 Software

Tab. 26: Software.

Software	Hersteller
Megacapt	Vilber Lourmat, Eberhardzell (D)
Step-One™ Bio-Rad Real-Time-System	BioRad Laboratories, München (D)
Step One™Real-Time PCR	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Tecan i-control 1.7	Tecan Deutschland, Crailsheim (D)
CFX Manager 3.1	BioRad Laboratories, München (D)
Excel 2016	Microsoft, Redmond, Washington (USA)
Sigma plot 12.5	Systat Software, Richmond (USA)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Alle Grafiken und Abbildungen, deren Herkunft in der Abbildungsunterschrift nicht näher beschrieben wurde, wurden durch den Autor dieser Arbeit erstellt.

Abb. 1: Schematischer Grundaufbau der funktionellen Einheit der Speicheldrüse (Azinus) mit angeschlossenem Gangsystem.....	1
Abb. 2: Prinzip des Tissue Engineering zum Ersatz von Organen oder Gewebe.	10
Abb. 3: Zusammenfassung der Methodik zur Evaluation der SIS-muc als Matrix für das Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse.	14
Abb. 4: Nativpräparat aus der humanen Ohrspeicheldrüse (Ø90 mm Petrischale).	15
Abb. 5: Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zellkammer.	21
Abb. 6: hSEZ in der FDA-Ethidiumbromid-Färbung.	22

Abb. 7: Aufbau des Dezellularisierungskreislaufs.....	25
Abb. 8: Schematischer Aufbau einer Zellkrone.	26
Abb. 9: Übersicht der Arbeitsschritte zum Einspannen der SIS-muc in Zellkronen.	27
Abb. 10: Schematische Darstellung des Prinzips des α -Amylase-Assay.....	34
Abb. 11: Errechnete Standardkurve des α -Amylase-Assay.....	36
Abb. 12: Schematische Darstellung der Phasenauftrennung bei RNA-isolation.....	41
Abb. 13: Schematische Funktionsweise der TaqMan-Sonde bei der RT-qPCR.	49
Abb. 14: Laufprotokoll für die Durchführung der RT-qPCR.....	51
Abb. 15: HE-Färbung eines Nativpräparats der humanen Ohrspeicheldrüse.	53
Abb. 16: Immunfluoreszenzaufnahmen eines Nativpräparats der humanen Ohrspeicheldrüse.....	53
Abb. 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von hSEZ.	54
Abb. 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mvEZ.	55
Abb. 19: Immunfluoreszenzaufnahmen der hSEZ in 2D-Kultur.....	56
Abb. 20: HE-Färbungen der in Monokultur mit hSEZ besiedelten SIS-muc.	58
Abb. 21: HE-Färbungen der in Kokultur von hSEZ und mvEZ besiedelten SIS-muc.	59
Abb. 22: REM-Aufnahmen der mit hSEZ besiedelten SIS-muc.....	60
Abb. 23: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mVEZ auf der SIS-muc gegen vWF (grün) und Panzytokeratin (rot).	61
Abb. 24: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Monokultur von hSEZ auf der SIS-muc gegen α -Amylase (rot) und Panzytokeratin (grün).	62
Abb. 25: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mvEZ auf der SIS-muc gegen α -Amylase (rot) und Panzytokeratin (grün).	63
Abb. 26: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Monokultur von hSEZ auf der SIS-muc gegen AQP-5 (rot) und Panzytokeratin (grün).	64
Abb. 27: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mvEZ auf der SIS-muc gegen AQP-5 (rot) und Panzytokeratin (grün).	65
Abb. 28: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Monokultur von hSEZ auf der SIS-muc gegen CL-1 (rot) und Panzytokeratin (grün).	66

Abb. 29: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der 3D-Kokultur von hSEZ und mvEZ auf der SIS-muc gegen CL-1 (rot) und Panzytokeratin (grün).	67
Abb. 30: TEM-Aufnahmen von auf der SIS-muc kultivierten hSEZ mit Teilvergrößerungen.	68
Abb. 31: TEM-Aufnahmen von Lumina-ähnlichen interzellulären Räumen und sekretorischen Vesikeln bei auf der SIS-muc kultivierten hSEZ.	69
Abb. 34: α -Amylase-Genexpression bei 2D-Kultur und 3D Mono- und Kokultur.	70
Abb. 35: α -Amylase-Enzymaktivitätsmessungen bei 2D-Kultur und 3D Mono- und Kokultur.	71
Abb. 32: Gelelektrophorese von EF1 α , α -Amylase und Zytokeratin 18.	72
Abb. 33: Primereffizienzbestimmung von EF1 α , GAPDH, α -Amylase und Zytokeratin 18.	73

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ablauf der Endothelzellisolation.....	17
Tab. 2: Ablauf des Passagierens von Zellen.	19
Tab. 3: Paraffineinbettung der SIS-muc.....	29
Tab. 4: Entparaffinierung der Schnitte vor der Färbung.	31
Tab. 5: Ablauf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	32
Tab. 6: Pipettierschema zur Erstellung einer Standardkurve beim α -Amylase-Assay...	35
Tab. 7: Fixierung der Proben für die TEM-Analyse.....	39
Tab. 8: Ablauf der RNA-Isolation von besiedelter SIS-muc.	42
Tab. 9: Arbeitsprotokoll des Thermocyclers bei der cDNA-Synthese.....	45
Tab. 10: Liste der für die Gradienten-PCR verwendeten Primer mit Sequenzen.....	46
Tab. 11: Gradienten-PCR Mastermix.	47
Tab. 12: Liste der für die RT-qPCR verwendeten Primer mit Sequenzen.	49
Tab. 13: RT-qPCR-Reaktionsmix.....	50
Tab. 14: Einzelschritte der PCR.....	50
Tab. 15: Verdünnungsreihe zur Ermittlung der Primer-Effizienz.	51

Tab. 16: Geräte.	91
Tab. 17: Verbrauchsmaterial.	93
Tab. 18: Labormaterial.....	95
Tab. 19: Chemikalien und Lösungen.....	96
Tab. 20: Medien und Puffer.	98
Tab. 21: Verwendete Primärantikörper.....	100
Tab. 22: Verwendete Sekundärantikörper.	101
Tab. 23: Kits mit Reaktionsmischungen.....	101
Tab. 24: Primer & PCR-Reagenzien.....	102
Tab. 25: Zelltypen.	102
Tab. 26: Software.	103
Tab. 27: Abkürzungen.	106
Tab. 28: α -Amylase-Enzymaktivitätswerte der Einzelpatienten.	109
Tab. 29: Gegen CK 18 normalisierte Amylase-Expressionswerte und Cq-Werte der RT-qPCR.....	111

7.4 Abkürzungen

Tab. 27: Abkürzungen.

μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AQP-1	Aquaporin 1
AQP-5	Aquaporin-5
AECM	Airway epithelial cell medium
BioVaSc	Biological vascularized scaffold
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
Ca	Calcium
cDNA	complementary DNA

CK-18	Zytokeratin-18
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DMEM	Dublecco's modified egale medium
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1- α
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetales Kälberserum
Fc-Teil	Konstante Antikörperdomäne mit Bindungsstelle
FDA	Fluorescein-Diacetat
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Gy	Gray
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPV	Humane Papillomaviren
HE	Hämatoxylin & Eosin
hSEZ	Humane Speicheldrüsenepithelzellen
Hz	Hertz
IgA	Immunglobulin A

IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
mA	Milliampere
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MOK	Miniorgankultur
mRNA	messenger RNA
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
mU	Milliunit
mvEZ	Mikrovaskuläre Endothelzellen
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
RT-qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SIS	Small intestinal submucosa
SIS-muc	Small intestinal mucosa

Tab.	Tabelle
TE	Tissue Engineering
TEM	Transelektronenmikroskopie
V	Volt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

7.5 Rohdaten

Tab. 28: α -Amylase-Enzymaktivitätswerte der Einzelpatienten.

Patient	Zellkulturtag	Aktivitätswert mU x ml ⁻¹
V1-Kontrolle	3	0,02721088
V1-Kontrolle	6	0,02752013
V1-Kontrolle	9	0,03772422
V1-Kontrolle	12	0,02442795
V1-Monokultur	3	0,08348795
V1-Monokultur	6	0,03525046
V1-Monokultur	9	0,07761291
V1-Monokultur	12	0,03339517
V1-Kokultur	3	0,65708103
V1-Kokultur	6	0,66821274
V1-Kokultur	9	0,2940631
V1-Kokultur	12	0,51360545
V2-Kontrolle	3	0,04514533
V2-Kontrolle	6	0,02999386

V2-Kontrolle	9	0,03834264
V2-Kontrolle	12	0,03153992
V2-Monokultur	3	0,09616578
V2-Monokultur	6	0,03401365
V2-Monokultur	9	0,03896108
V2-Monokultur	12	0,03988871
V2-Kokultur	3	0,30643167
V2-Kokultur	6	0,21737788
V2-Kokultur	9	0,59678416
V2-Kokultur	12	0,41929502
V3-Kontrolle	3	0,03957947
V3-Kontrolle	6	0,03123072
V3-Kontrolle	9	0,03432285
V3-Kontrolle	12	0,04112552
V3-Monokultur	3	0,14996911
V3-Monokultur	6	0,05040203
V3-Monokultur	9	0,04112555
V3-Monokultur	12	0,04019791
V3-Kokultur	3	1,24984535
V3-Kokultur	6	0,72974645
V3-Kokultur	9	0,24799011
V3-Kokultur	12	1,51917138

Tab. 29: Gegen CK 18 normalisierte Amylase-Expressionswerte und Cq-Werte der RT-qPCR.

Zielgen/Patient	Probe	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
α -Amylase V1	2D-Kultur	1,00000	0,09226	32,35	0,08460
α -Amylase V1	3D-MK T7	-	-	-	-
α -Amylase V1	3D-MK T14	4,09243	0,36009	29,95	0,07509
α -Amylase V1	3D-KK T7	1,64216	0,23662	30,92	0,19403
α -Amylase V1	3D-KK T14	1,75416	0,24045	31,62	0,18445
α -Amylase V2	2D-Kultur	1,00000	0,01888	31,58	0,02164
α -Amylase V2	3D-MK T7	5,49076	1,05328	33,72	0,26667
α -Amylase V2	3D-MK T14	4,26709	0,40771	33,68	0,13453
α -Amylase V2	3D-KK T7	3,64185	0,81459	36,96	0,20751
α -Amylase V2	3D-KK T14	4,90833	0,38576	37,31	0,10548
α -Amylase V3	2D-Kultur	1,00000	0,10686	29,89	0,11459
α -Amylase V3	3D-MK T7	0,44154	0,09815	35,58	0,31387
α -Amylase V3	3D-MK T14	0,54526	0,12791	33,34	0,17698
α -Amylase V3	3D-KK T7	0,50353	0,33459	37,99	0,93076
α -Amylase V3	3D-KK T14	0,34129	0,05928	37,74	0,24007

8. Danksagung

Ich bedanke mich bei den Herren Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, Dr. Marco Metzger und Dr. Marc Burghartz für die besondere Gelegenheit, innerhalb der Kooperation zwischen dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin und der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenkrankheiten und plastische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg meine Promotionsarbeit durchführen zu können. Die Arbeit im Spannungsfeld zwischen Grundlagenforschung und klinischer Translation hat mir viel Freude bereitet und mich immer wieder aufs Neue motiviert.

Danken möchte ich auch den drei Mitgliedern meines Promotionskomitees, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, Herrn Prof. Dr. rer. nat Torsten Blunk und Herrn Dr. Marco Metzger für die stete, geduldige Beratung, die motivierenden Worte und die fachkundige Kritik, die für Durchführung und Niederschrift der Arbeit unverzichtbar waren.

Ein großes Dankeschön gilt den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, die mich herzlich aufgenommen und nach Kräften unterstützt haben: allen voran Dr. Matthias Schweinlin, Sabine Wilhelm, Sylvia Murawicki und Lena Müller für deren immerwährende Hilfsbereitschaft.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Evelyn Kolb und Gudrun Steußloff sowie bei Petra Joa für die schöne und überaus erkenntnisreiche Zeit der gemeinsamen Arbeit im Labor der AG Kleinsasser.

Von Herzen dankbar bin ich meiner ganzen Familie, die mich seit jeher trägt und begleitet: Meinen Eltern und Großeltern und meinen Brüdern David und Benjamin.

Zuletzt danke ich Monique Kaiser, die diese Arbeit von Anfang bis Ende in ihrer unverwechselbaren Art bereichert hat.

Köln, 13.02.2018

Simon Lennartz

10. Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Tissue Engineering der menschlichen Speicheldrüse unter Verwendung von Epithel- und mikrovaskulären Endothelzellen auf einer Matrix aus dezellularisiertem Schweinedarm“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Köln, 13.02.2018

Simon Lennartz

I hereby confirm that my thesis entitled “Tissue engineering of human salivary gland using epithelial and microvascular endothelial cells on a decellularized porcine matrix” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Cologne, 13.02.2018

Simon Lennartz