

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenkrankheiten,  
plastische und ästhetische Operationen  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen  
Betreuer: Professor Dr. med. N. Kleinsasser MHBA

Kultivierung von  
humanem Speicheldrüsengewebe  
in einer dreidimensionalen  
Polyurethanmatrix



Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde an der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Serge - Peer Ströhle  
Würzburg

Würzburg, Februar 2020



Eingereicht am: Februar 2020

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

Vorsitzender:

1. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med Norbert Kleinsasser, MHBA
2. Betreuer: PD Dr. sc. hum. Marco Metzger

**Tag des Promotionskolloquiums: 05.11.2020**

Der Promovend ist Arzt.

# INHALT

---

<b>I. INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>III. TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>

## I. INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren, Histologie und Behandlungsfolgen von Kopf-Hals-Tumoren .....	1
1.2 Therapieansätze zur Regeneration einer geschädigten Speicheldrüse ....	2
1.2.1 Getherapeutischer Ansatz .....	4
1.2.2 Stammzell-basierte Regeneration.....	7
1.2.3 Organersatz durch Tissue Engineering.....	10
1.3 Wachstum und Migration von Zellen auf einer Trägersubstanz .....	12
1.4 Einflüsse der Biomaterialien mit molekularen Gradienten auf die Zellmigration und Geweberegeneration .....	14
1.4.1 Zellmigration auf einer dreidimensionalen Matrix und mögliche Anwendungen in der Geweberegeneration.....	15
1.5 Ziel der Arbeit.....	16
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
2.1 Probanden und Patienten.....	17
2.2 Gewinnung der Ohrspeicheldrüsenzellen.....	17
2.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung .....	19
2.4 Vorbereitung des Trägermaterials Polyurethan .....	21
2.5 Übertragung der Parotiszellen auf die Matrices .....	21
2.6 Histologische Praktiken und Untersuchungen.....	23
2.6.1 Bestimmung der <i>in vitro</i> gezüchteten Parotiszellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	28

# INHALT

---

2.6.2	Darstellung der Zellmorphologie mit Pan-Cytokeratin.....	28
2.6.3	Mikroskopische Bildaufnahmen der Immunfluoreszenz .....	30
2.6.4	Bildanalyse mit Hilfe des Raster- und Transmissionselektronenmikroskops .....	31
2.6.5	Einsatz der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion .....	34
2.6.6	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion zur Funktionstestung der Primer $\alpha$ -Amylase, Cytokeratin 7 und Aquaporin 5.....	37
2.6.7	Analyse der relativen Genexpression .....	38
2.6.8	Agarosegelelektrophorese .....	39
2.7	Vorgehen bei der statistischen Auswertung .....	40
<b>3</b>	<b>DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
3.1	Beschreibung der Studienkohorte .....	42
3.2	Histologische Untersuchungen.....	45
3.2.1	Untersuchung auf $\alpha$ -Amylase und Pan-Cytokeratin durch indirekte Immunfluoreszenz.....	45
3.2.2	Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der besiedelten Konstrukte zum Untersuchungstag 7 .....	47
3.2.3	Transmissionsmikroskopaufnahmen der besiedelten Konstrukte zum Untersuchungstag 14.....	49
3.3	Nachweis von $\alpha$ -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 7 mittels Real- Time-Polymerase-Kettenreaktion .....	49
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
4.1	Humane Parotiszellen <i>ex vivo</i> .....	54
4.2	Humane Parotiszellen <i>in vitro</i> .....	58
4.3	Kritische Betrachtung der Ergebnisse anhand der aktuellen Forschungsliteratur.....	60
4.3.1	Die Isolation von aktiven Zellen .....	60
4.3.2	Polyurethan als Trägermedium.....	63
4.3.3	Herstellung der Schnittpräparate .....	65
4.3.4	Gesamtschau.....	68
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>72</b>
6.1	Tabellen der Messergebnisse .....	72
6.2	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien .....	74
6.3	Copyright und Lizenzen.....	80
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>83</b>

---

## INHALT

---

<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>101</b>

## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Bild einer Mundhöhle mit Xerostomie .....	2
Abbildung 2:	Darstellung des Gentransfers durch adenovirale Übertragung .....	5
Abbildung 3:	Schematische Darstellung diverser Adenovirus-Varianten .....	6
Abbildung 4:	Bild eines sterilen $\epsilon$ -Caprolacton - Polyurethan-Schwämmchens mit beiliegendem Maßstab ( $\varnothing$ 5 mm; Höhe 2 mm) .....	12
Abbildung 5:	Schematische Zeichnung einer Zellmigration: Sagittale und axiale Ansicht einer Zelle. ....	13
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus .....	19
Abbildung 7:	Typisches Bild einer Vitalfärbung .....	20
Abbildung 8:	Overlay der FDA/EB-Vitalfärbung .....	21
Abbildung 9:	Herstellung der Polyurethan-Matrix .....	21
Abbildung 10:	Polyurethan-Matrix in 2,5- facher Vergrößerung .....	22
Abbildung 11:	Sandwich-ELISA Test .....	26
Abbildung 12:	Mechanismus der Taq-Man PCR .....	35
Abbildung 13:	Beispiel einer Gelelektrophorese .....	39
Abbildung 14:	Lebend/Tot Färbung .....	44
Abbildung 15:	Boxplot-Diagramm der gemessenen $\alpha$ -Amylase-Konzentration mittels ELISA .....	45
Abbildung 16:	Immunhistochemische Färbung gegen $\alpha$ -Amylase (Alexa Fluor 488) .....	46
Abbildung 17:	Immunhistochemische Färbung gegen Pan-Cytokeratin (Alexa Fluor 488) .....	47
Abbildung 18:	Besiedeltes Konstrukt in Rasterelektronenmikroskopdarstellung .....	48
Abbildung 19:	Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen .....	49
Abbildung 20:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Cytokeratin 7 .....	50
Abbildung 21:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von $\alpha$ - Amylase .....	51
Abbildung 22:	Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Aquaporin 5 .....	51
Abbildung 23:	Gelelektrophorese von 6 Proben zum Nachweis spezifischer Gene für GAPDH, $\alpha$ -Amylase und Aquaporin 5. ....	52
Abbildung 24:	REM-Übersichtsbild des besiedelten Konstruktes .....	58

# INHALT

---

Abbildung 25: Graphische Darstellung der Auftragung der Zellen auf einer Matrix aus Hyaluronsäure-Hydrogel.....	59
Abbildung 26: Eingebettete Proben im Paraffinblock.....	66
Abbildung 27: Eingefrorene besiedelte Matrix .....	67

# INHALT

---

## III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Zielstrukturen der Immunfluoreszenz.....	29
Tabelle 2:	Fluorescein-markierte Zweitantikörper.....	30
Tabelle 3:	Zusammensetzung TaqMan-Assay.....	37
Tabelle 4:	Inkubation der Proben im Analysegerät für die RT-PCR.....	37
Tabelle 5:	Charakteristika der Studienkohorte:.....	43
Tabelle 6:	Durchschnittliche C <sub>t</sub> -Werte aller Passagen der Patienten 1-3.....	50
Tabelle 7:	α-Amylase-Enzymaktivitätswerte in U/l der 20 Patienten (Pat.) der Untersuchungstage (UT) 7-21.....	72
Tabelle 8:	C <sub>t</sub> -Werte des nativen humanen Parotiszewebes der Patienten A und B in Duplikaten (D) 1 und 2.....	72
Tabelle 9:	C <sub>t</sub> -Werte der <i>in vitro</i> kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Untersuchungstage (UT) 7-21 in Duplikaten (D) für Cytokeratin 7.....	72
Tabelle 10:	C <sub>t</sub> -Werte der <i>in vitro</i> kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Untersuchungstage 7-21 in Duplikaten (D) 1 und 2 für α-Amylase.....	73
Tabelle 11:	C <sub>t</sub> -Werte der <i>in vitro</i> kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Untersuchungstage 7-21 in Duplikaten (D) 1 und 2 für Aquaporin 5.....	73
Tabelle 12:	Geräte.....	74
Tabelle 13:	Verbrauchsmaterialien.....	75
Tabelle 14:	Chemikalien.....	76
Tabelle 15:	Nährmedium und Zusätze.....	78
Tabelle 16:	Antikörper.....	79

# INHALT

---

## IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
AQP	Aquaporin
AQP1	Aquaporin 1
AQP5	Aquaporin 5
BEG-Medium	Bronchialepithelialzellen-Wachstumsmedium, engl. <i>Bronchial Epithelial Growth Medium</i>
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca	circa
kDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid, cDNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C <sub>t</sub>	<i>Cycle threshold</i>
CK	Cytokeratin
CK7	Cytokeratin 7
c-KIT	Zell-Rezeptortyrosinkinase, engl. <i>Cell receptor tyrosine kinase</i>
Cl1	Claudin 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CPD	Kritisch-Punkt-Trocknung, engl. <i>Critical Point Drying</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DME-Medium	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure

## INHALT

dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRG	Dorsales Rattenganglion
EB	Ethidiumbromid
EZM	Extrazellulärmatrix
ED	Ethidiumbromid
EHS	Englebreth-Holm-Swarm
EIA	Enzym-Immunotest, engl.: <i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, engl. <i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fötale Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FDA	Fluorescein-Diacetat-Ethidiumbromid
FGF	Gen für einen Wachstumsfaktor für Fibroblasten, engl. <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFR	Reduzierter Wachstumsfaktor, engl. <i>Growth Factor Reduced</i>
h	Stunde
hADSZ	Humane adipöse Stammzellen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor, engl. <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HPG	Natives Humanes Parotisgewebe
HS	Hyaluronsäure
hSEZ	Humane Speicheldrüsenepithelzellen
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie, engl. <i>Intensity- Modulated Radiation Therapy</i>
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen

## INHALT

KHPZ	Kultivierte humane Parotiszellen
l	Liter
Lsg	Lösung
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOK	Mini-Organkultur
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
mvEZ	Mikrovaskuläre Endothelzellen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
o. g.	Oben genannt
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCL	Polycaprolacton
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PPG	Polypropylenglycol
PUR	Polyurethan
RAM	Arbeitsspeicher, engl. <i>Random Access Memory</i>
RCA	Replikationskompetenter Adenovirus, engl. <i>Replication Competent Adenovirus</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIA	Radioimmunassay
RNS	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid, RNA</i>

## INHALT

---

RNAsen	Ribonukleasen
rpm	Runden pro Minute; engl.: <i>revolutions per minute</i>
RPMI	Zellmedium mit definierten Zusätzen, engl. <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
sec	Sekunde
SMG	Submandibularspeicheldrüse
Tab	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TJ	Schlussleiste, engl. <i>Tight Junctions</i>
UT	Untersuchungstag
VEGF	Gen für einen Wachstumsfaktor des Gefäßendothels, engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VE-Wasser	Watt vollentsalztes Wasser
W	Watt

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren, Histologie und Behandlungsfolgen von Kopf-Hals-Tumoren

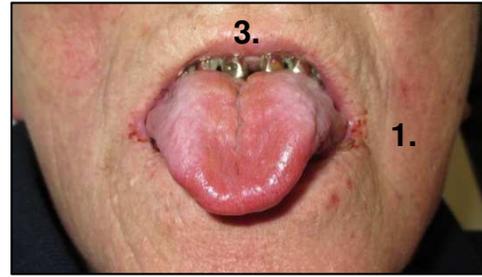
Etwa 30 Prozent aller Krebserkrankungen im Bereich von Kopf und Hals sind Tumore der Mundhöhle. Es handelt sich dabei in der Schleimhaut von Wangen, Mundboden, Zunge, Ober- und Unterkiefer, Alveolarkammer, retromolarem Dreieck, hartem und weichem Gaumen sowie Lippen, in der überwiegenden Anzahl um Plattenepithelkarzinome. Diese Karzinome stehen der Häufigkeit nach weltweit an 6. Stelle aller Krebserkrankungen (Mishra, 2012). Die jährliche Inzidenz wird weltweit auf über 350.000 Fälle geschätzt, die Mortalitätsrate belief sich 2018 auf 177.384 (Bray *et al.*, 2018). Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts nahm die Zahl der jährlich neu aufgetretenen Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich zwischen den Jahren 1980 bis 2006 um 35% bei Frauen und um mehr als 80% bei Männern zu. Als wichtigste Risikofaktoren sieht das Robert-Koch-Institut Tabak- und Alkoholkonsum sowie eine chronische Infektion mit humanen Papillomviren (Robert-Koch-Institut, 2016). Die Entstehung der Tumore im Kopf-Hals-Bereich wird außerdem mit der Exposition bestimmter Stoffe, wie Asbest, Arsen, Nickel, Chrom oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe in Zusammenhang gebracht (Schlesinger-Raab *et al.*, 2014). Für einige Unterarten dieser Krebserkrankungen stehen als Auslöser auch Viren, HPV-16 bei Mundhöhlen- und Larynx-Karzinomen (Gillison, 2008), und Ernährungsfaktoren zur Diskussion (Robert-Koch-Institut, 2017). Ebenso können schlechte Mundhygiene und chronische Traumen der Mundschleimhaut durch Prothesen oder Zähne die Gefahr einer Erkrankung steigern. Bei positiver Familienanamnese wird ein erhöhtes Risiko von 3,5 angenommen, an einem Kopf-Hals-Tumor zu erkranken (Anaya-Saavedra *et al.*, 2008). Das mittlere Manifestationsalter beträgt 60 +/- 15 Jahre, wobei Männer ca. viermal so häufig betroffen sind wie Frauen (Ferlay *et al.*, 2018; Pisani *et al.*, 1999). Etwa 90 Prozent dieser Krebserkrankungen sind Plattenepithelkarzinome. Dabei handelt es sich um maligne Tumore von Epithelien der Haut und Schleimhaut, die engl. als *head and neck squamous cell carcinoma*; und deutsch als Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses bezeichnet werden (Hoffman *et al.*, 1998). Solide Tumore werden primär oder adjuvant, das heißt nach Operation, mit Bestrahlung therapiert. Dies hat insbesondere zur Folge, dass die Speicheldrüsen in diesem

## 1 Einleitung

Bereich einen Funktionsverlust erleiden, was zu einer Einschränkung der Speichelproduktion führt. Die Folgen sind Xerostomie, die sogenannte Mundtrockenheit, Karies und auch Infektionen durch Pilzbefall, siehe Abbildung 1.

Es können starke Probleme mit dem Schlucken auftreten, da die Nahrung nicht mehr in ausreichendem Maße eingespeichelt werden kann. Gerade diese Schwierigkeiten vermindern die

Lebensqualität des Patienten in hohem Maße. Aus den genannten Gründen gab es zahlreiche Versuche, Speicheldrüsengewebe neu anzuzüchten. Bereits im Jahre 1971 konnte von HANKS und CHAUDHRY gezeigt werden, dass sich Speicheldrüsen bei Ratten nach partieller Entfernung sehr gut erholen können (Hanks und Chaudhry, 1971). Aus der Arbeitsgruppe des Niederländers COPPES wurde 2008 ein möglicher klinischer Ansatz zur Anregung von Zellwachstum von Drüsengewebe durch Stammzelltransplantation beschrieben (Lombaert *et al.*, 2008). Auch die Generierung einer artifiziellen Kopfspeicheldrüse ist Gegenstand verschiedener Forschungsbemühungen. Deshalb knüpft die vorliegende Arbeit an diesen Erfolg von LOMBAERT *et al.* an, die Speicheldrüsengewebe nach einer Schädigung durch Strahlen- und Chemotherapie regenerieren half.



**Abbildung 1: Bild einer Mundhöhle mit Xerostomie**

Zu sehen sind **1.** an den Mundwinkeln Rhagaden, **2.** am lateralen Zungenrand Pilzbefall, **3.** am Oberkiefer Zahnersatz bei Z. n. Exzision.

### 1.2 Therapieansätze zur Regeneration einer geschädigten Speicheldrüse

Weltweit arbeiten Forschungsteams an der Entwicklung neuer medikamentöser Therapien. So untersuchte eine Arbeitsgruppe um FISHER *et al.* (2003) den Einsatz des Medikaments Pilocarpin zur Reduzierung strahlenbedingter Xerostomie. Die Phase III-Studie führte jedoch nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Zwar war die Speichelproduktion nach Strahlentherapie im Kopf- Hals-Bereich gegenüber der Placebogruppe erhöht, jedoch waren die damit verbundenen Nebenwirkungen so gravierend, dass diese eine größere Rolle auf die Lebensqualität gespielt hatte.

Gegenstand aktueller Forschungen ist es auch, die Auswirkungen der Strahlentherapie auf das betroffene Gewebe zu minimieren. Erste Ergebnisse von WASSERMAN *et al.* (2005) zeigten hier eine vielversprechende Tendenz, insbesondere mit dem Medikament Amifostin. Anschlussstudien konnten diese jedoch nicht bestätigen (Rudat *et al.*, 2008).

Generell berichten Betroffene vor allem von einer unangenehmen Mundtrockenheit. Diese ist verursacht durch eine Verminderung der Speichelsekretion aufgrund der Strahlentherapie. Dabei ist zu beachten, dass der Begriff Xerostomie (griech.: xeros = trocken, stoma = Mund) keine Diagnose ist, vielmehr beschreibt er zunächst nur das subjektive Empfinden einer Mundtrockenheit. Die Hyposalivation hingegen entspricht einer tatsächlich eingeschränkten Speichelproduktion wobei die Oligosalivie einen verminderten Speichelfluss bezeichnet. Kann überhaupt kein Speichelfluss mehr nachgewiesen werden, liegt eine Asialivie vor (Orellana *et al.*, 2006).

Aus therapeutischer Sicht gibt es einige Möglichkeiten, die postradiogene Mundtrockenheit zu minimieren. Eine Möglichkeit stellt die chirurgische Verlegung der Speicheldrüsen dar. Exemplarisch ist hier die Technik der sogenannten Autotransplantation der Unterkieferspeicheldrüse nach HAGEN (2016) zu nennen. Bei diesem chirurgischen Verfahren wird die Submandibulärspeicheldrüse in den Unterarm des Patienten vor Beginn der Radiotherapie autotransplantiert und 2-3 Monate nach Abschluss der Bestrahlung in den Mundbodenbereich reimplantiert. Eine Studie unter Einschluss einer höheren Patientenzahl steht aktuell aus.

In einzelnen Studien konnte auch ein Effekt durch eine nicht invasive Intervention auf die Mundtrockenheit gezeigt werden. Eine verbesserte Speichelflussrate durch Akupunktur wurde während und nach Durchführung beobachtet (Blom *et al.*, 1992). In einer Metaanalyse aus dem Jahre 2018 konnten die Verbesserungen der Speichelflussrate jedoch nicht bestätigt werden (Assy und Brand, 2018). Häufig werden auch medikamentöse Therapien eingesetzt, um den Speichelfluss zu verbessern. Es handelt sich dabei um das systemisch wirkende Acetylcholin-Analogon Pilocarpin (Fisher *et al.*, 2003). Bei der Anwendung sind somit unerwünschte Nebenwirkungen aufgefallen, die in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2014 detailliert erfasst wurden. Übelkeit, Erbrechen, erniedrigter Blutdruck und allergische Reaktion traten bei mindestens 4 % der untersuchten Patienten mit einer Wirkung von Grad 3-4 nach dem Einteilungsprofil der RTOG auf (Gu *et al.*, 2014).

Im Jahr 2000 beschrieben JHA *et al.* eine weitere Möglichkeit, die drohende Entwicklung der Mundtrockenheit, ausgelöst durch die Bestrahlung, zu verhindern: Sie verlegten die Drüsen in den submentalen Bereich, zwischen Kinn und Zungenbein, um auf diese Art Beeinträchtigungen durch Strahlenschäden zu vermeiden (Jha *et al.*, 2000). SAIBISHKUMAR *et al.* (2007) entwickelten das Verfahren der intensitätsmodulierten Radiotherapie (engl. *Intensity-modulated radiotherapy*, IMRT). Durch IMRT lässt sich

eine deutliche Verbesserung der Dosisverteilung erreichen. Unter anderem ist es mit der Therapie möglich, die Intensität der Strahlendosis innerhalb eines Bestrahlungsfeldes zu modulieren. Es wird also nicht mehr eine über das gesamte Bestrahlungsfeld gleichmäßige Dosisverteilung gewählt, sondern das Feld wird in viele kleine Teilbereiche zerlegt, die mit jeweils unterschiedlicher Intensität und damit auch in unterschiedlichen Dosen bestrahlt werden. Der Querschnitt eines Strahlenbündels hat nun an jedem einzelnen Punkt seines Feldes die gewünschte Intensität (Zabel *et al.*, 2002). Eine essenzielle Bedingung bei der Technik der IMRT ist die Lagerungsgenauigkeit. Bei minimalen Änderungen in der Position des zu bestrahlenden Bereiches kann es zu einer höheren Belastung von Risikostrukturen oder einer inkompletten Erfassung des Zielvolumens, beispielsweise durch geringgradige Rotation des Kopfes kommen. Aus diesem Grund sind höchste Präzision bei der Fixierung und der Lagerung des Patienten notwendig (Sterzing *et al.*, 2011).

### 1.2.1 Genterapeutischer Ansatz

Ein genterapeutischer Therapieansatz besteht darin, die normale Speichelsekretion nach Behandlung durch Radiatio wiederherzustellen. Dafür kann das Gen für Aquaporin 1 (AQP1) durch einen adenoviralen Ansatz in die Zelle transfiziert werden, siehe Abbildung 2 auf der folgenden Seite. Dies gelang im Jahre 1997 einer Forschergruppe um DELPORTE. Sie erzielte mit dieser Methode im Nagermodell eine zwei- bis dreifache Steigerung der Speichelsekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der kein Gentransfer vorgenommen wurde (Delporte *et al.*, 1997).

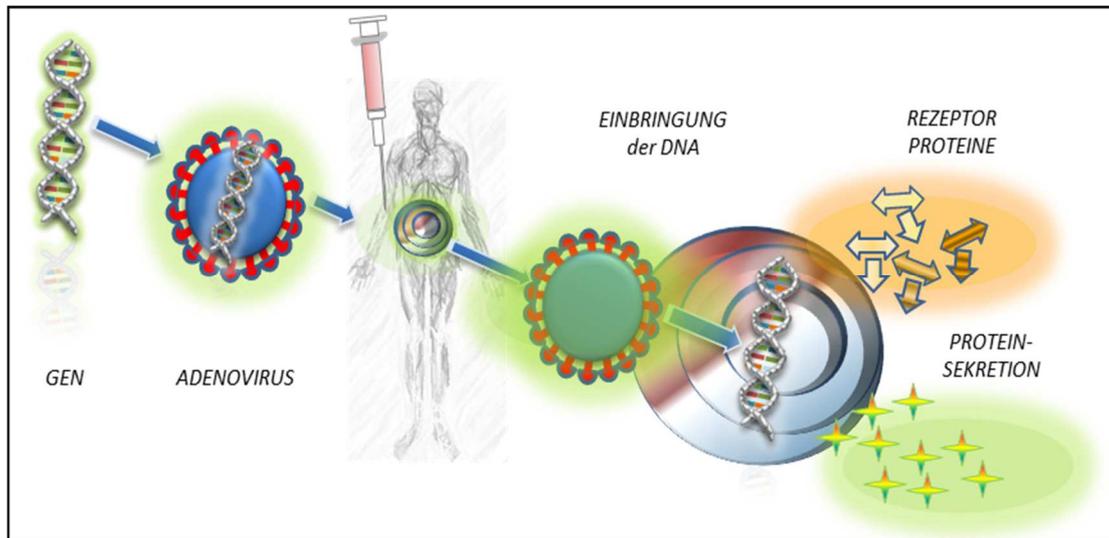
Ein Blick in die Forschungsliteratur zeigt, dass es grundsätzlich zwei unterschiedliche Wege dieser Genterapie gibt: Die indirekte Methode, die *ex vivo* durchgeführt wird. Dabei werden dem Patienten Zellen entnommen, welche in einer Kultur modifiziert und anschließend re-transplantiert werden.

Dem gegenüber steht die direkte Methode, *in vivo* ausgeführt. Es handelt sich dabei um eine Gentransfer-Methode, bei der ein Vektor dazu dient, das veränderte Zielgen direkt in den Organismus des Patienten einzubringen.

In der hier vorgeschlagenen Methode zum Gentransfer wird das modifizierte Zielgen, das als Vektor fungiert, in ein spezielles Virus, den Adenovirus, eingebracht. Auf diesem Weg gelangt das Virus, samt seiner veränderten DNS, in den Organismus, bzw. in die Zielzelle und wirkt als so genannter viraler Vektor. Im Nukleus der Zelle kommt

## 1 Einleitung

es zur Ausbildung von Proteinen auf Grundlage des Zielgens (Rezeptorproteine/Proteinsekretion). Abbildung 2 zeigt den Gentransfer durch adenovirale Übertragung schematisch auf.



**Abbildung 2: Darstellung des Gentransfers durch adenovirale Übertragung**

Das gewünschte modifizierte Zielgen (Gen) wird als Vektor in ein spezielles Virus (Adenovirus) eingebracht. Durch Applikation des Virus in den Organismus kommt es zu einer Transfektion des Vektors in die Zielzelle (Einbringung der DNA). Nach Einbringung des Zielgens bildet sich der virale Vektor aus (Rezeptorproteine/Proteinsekretion).

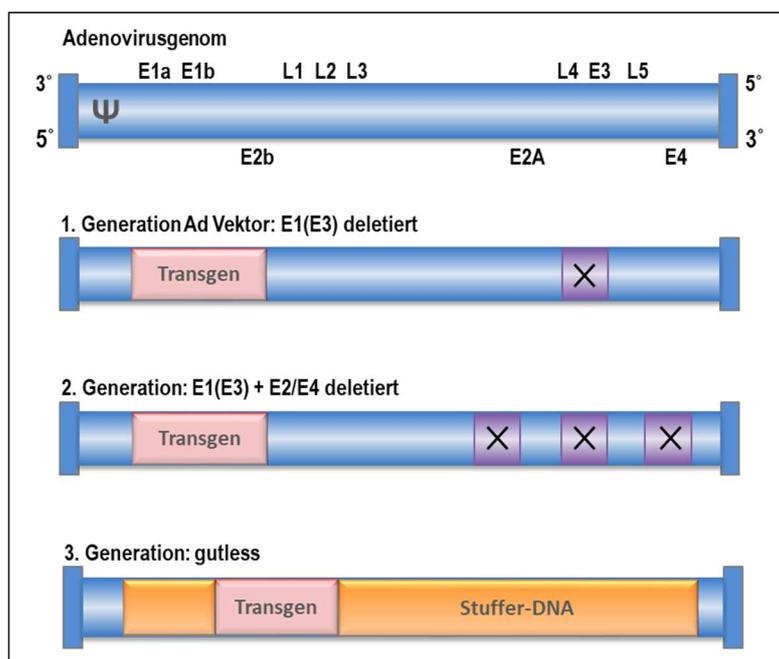
Die Arbeitsgruppe um COTRIM *et al.* behandelte Ratten 48 Stunden vor der Bestrahlung mit einem Gen für einen Wachstumsfaktor des Gefäßendothels (engl.: *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) oder einem Gen für einen Wachstumsfaktor für Fibroblasten (engl. *Fibroblast Growth Factor*, FGF), beides aus Studien bekannte angiogene Proteine. In Folge der Behandlung konnte bei den Tieren eine Verbesserung von 70 Prozent für VEGF und 80 Prozent für FGF ihres Speichelflusses gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden (Cotrim *et al.*, 2007).

Bei der Durchführung der Therapie haben sich insgesamt drei Verfahren herauskristallisiert. Zum Gentransfer liegen Vektoren der ersten und zweiten Generation vor. In der ersten Generation wird, wie Abbildung 3 zeigt, der essenzielle E1-Bereich (Early) mit ca. 3 kb durch eine Expressionskassette für das Transgen ersetzt. In einigen dieser Vektoren ist außerdem der für die Replikation nicht essenzielle E3-Bereich deletiert, was weitere 3 kb Verpackungskapazität für Fremdsequenzen schafft. Da das Virus von der E1-Expression abhängig ist, sind diese Vektoren aber nicht vermehrungsfähig. Darüber hinaus besteht das Problem, dass während der Produktion des Vektors durch

## 1 Einleitung

homologe Rekombination wieder vermehrungsfähige E1-positive Adenoviren (Replikationskompetenter Adenovirus, engl.: *Replication Competent Adenovirus*, RCA) entstehen können. Außerdem exprimieren diese Adenovirusvektoren noch geringe Mengen viraler Proteine. Diese können u. U. eine antiadenovirale Immunantwort auslösen, was die Expressionsdauer dieser Vektoren *in vivo* begrenzt.

In Vektoren der zweiten Generation, ebenfalls zu sehen in der Grafik Abbildung 3, sind die E1, E2, E4 und teilweise auch die E3-Vektoren deletiert. Sie weisen eine geringere Toxizität auf, und auch ihre Immunogenität ist im Vergleich zur ersten Generation besser.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung diverser Adenovirus-Varianten**

Dargestellt ist das Adenovirusgenom mit den terminalen ITR's (Inverted Terminal Repeats, senkrechter dunkelblauer Balken), dem Verpackungssignal ( $\psi$ ) und den Early- und Late-Transkriptionseinheiten (E, L). In der 1. Generation des Vektors sind die Expressionskassette des Transgens sowie der deletierte Genombereich (X) dargestellt. In der 2. Generation sind zusätzliche deletierte Genombereiche an der Stelle E2/E4 für eine vermehrte Verpackungskapazität zu sehen. Die 3. Generation weist lediglich  $\psi$ , das Transgen und den durch Stuffer-DNS ersetzten Genombereich auf. Modifiziert dargestellt nach Danthinne und Imperiale (2000).

Bei einer möglichen Therapie durch einen Helfervirus-abhängigen Adenovirus-Vektor handelt es sich um die neueste, die dritte Generation (Danthinne und Imperiale, 2000). Abbildung 3 lässt erkennen, dass im Genom dieser Vektoren vom Adenovirus nur die cis-aktiven Sequenzen für die Replikation und Verpackung des viralen Genoms verblieben sind. Neben Expressionskassetten für das Transgen enthält das Genom noch sogenannte nicht kodierende Stuffer-DNS, da die optimale Verpackungsgröße eines

adenoviralen Genoms zwischen 27 und 38 kb liegt. Dieser Vektortyp ist nicht toxisch und auch die Immunogenität ist sehr gering. Ein weiterer, für den praktischen Einsatz nicht unerheblicher Vorteil liegt darin, dass er eine monatelange Expression des Transgens *in vivo* in ruhenden Zeiten ermöglicht.

Zur Produktion dieser sogenannten Gutless-Vektoren wird ein Helfervirus benötigt, das alle Genprodukte für die Replikation und Verpackung des Vektorgenoms bereitstellt. Damit ist eine Kontamination mit replikationskompetenten Helferviren unausweichlich (Somia und Verma, 2000). Hier zeigt sich auch aktuell die Begrenzung der Anwendung. Verfahren, die Helferviruskontaminationen vermindern, sind Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen.

Neben den genannten Problemen gibt es Bedenken bezüglich der Sicherheit beim Einsatz von viralen Vektoren. Eine Insertionsmutation und die Entstehung von replikationskompetenten Viren sind möglich. Ebenfalls wurde durch die Anwendung von Viren als Vektor-Überträger eine systemische Immunantwort wie eine Leukämie-ähnliche Erkrankung beobachtet (Woods *et al.*, 2006). Im Jahre 2017 wurde erstmals durch eine Arbeitsgruppe um ALEVIZOS untersucht, ob bei Patienten, die eine humorale und zelluläre Immunantwort bei Behandlung aufzeigen, eine Therapie durch Vektor-Transfektion für AQP1 versagt. ALEVIZOS *et al.* kamen zum Ergebnis, dass keine Vorhersage bezüglich einer beobachteten moderaten Immunantwort und einer erfolgreichen Gen-Therapie getroffen werden kann. Bei stärkerer Reaktion des Immunsystems muss jedoch von einer Beeinträchtigung der durchgeführten Therapie ausgegangen werden (Alevizos *et al.*, 2017).

### 1.2.2 Stammzell-basierte Regeneration

Die Mobilisation von Stammzellen stellt ebenfalls eine experimentelle Möglichkeit dar, Speicheldrüsengewebe zu regenerieren. Insbesondere die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung der verschiedenen Stammzelltypen wurde in Studien untersucht.

LOMBAERT *et al.* konnte im Jahr 2008 zeigen, dass durch die Transplantation autologer epithelialer Stammzellen mit dem Zelloberflächenmarker KIT (c-KIT) eine morphologische Erneuerung und funktionelle Verbesserung strahlengeschädigter Speicheldrüsen bei Mäusen erzielt werden konnte. Nach Isolierung der primären Speicheldrüsenzellen von Mäusen und autonomer Formierung in Salisphären während der Kul-

tivierung wurden die Speicheldrüsenzellen immunhistochemisch nach 3 Tagen charakterisiert. Die c-KIT positiven epithelialen Duktalzellen mit der Co-Expression CD117 wurden durch Injektion direkt in irreversibel strahlengeschädigte Speicheldrüsen transplantiert. Bereits bei einer Anzahl von 300 – 1.000 c-KIT positiven Zellen konnte eine Verbesserung beobachtet werden. Um die Langzeitwirkung der Zellen zu überprüfen, wurden nach 90 Tagen zusätzlich 100 c-KIT Zellen aus den untersuchten Speicheldrüsen entnommen und erneut transplantiert. Wiederholt konnte eine Verbesserung der eingeschränkten Speicheldrüsenfunktion festgestellt werden (Lombaert *et al.*, 2008).

Die Arbeitsgruppe um NANDURI zeigte, dass c-KIT positive Zellen mit Co-Expression von CD positiven Oberflächenmarker 24 und 49f zu ähnlichen morphologischen und funktionellen Verbesserungen nach Transplantation in Speicheldrüsen von Mäusen führten (Nanduri *et al.*, 2013). XIAO *et al.* legte in seinen Ergebnissen dar, dass nach Isolierung verschiedener Zellen die c-KIT<sup>+</sup>Lin-CD24<sup>+</sup> Sca1<sup>+</sup> Subpopulation am erfolgreichsten die Speichelproduktion wiederherstellte und die Anzahl an funktionellen Acini erhöhte (Xiao *et al.*, 2014).

Nicht nur die epithelialen Stammzellen konnten in Studien einen positiven Einfluss auf Morphologie und Funktion von Speicheldrüsen vorweisen, auch die Gruppe der nicht epithelialen spezifischen Zelltypen und bioaktive Lysate aus Stammzellen wurden erforscht.

Verschiedene Studien untersuchten induzierte, pluripotente Stammzellen (iPS) mesenchymale Stammzellen (MSZ) von menschlichen Fettzellen (humane adipöse Stammzellen; hADSZ) (Xiong *et al.*, 2014), und Stammzellen vom Knochenmark (Lombaert *et al.*, 2006; Sumita *et al.*, 2011).

iPS sind Zellen aus nicht-pluripotenten, ausdifferenzierten Primärzellen, die durch Einbringung bestimmter Transkriptionsfaktoren die Eigenschaft der Differenzierung ähnlich embryonaler Stammzellen erhalten. ONO *et al.* konnte zeigen, dass Kokulturen von embryonalen Submandibularzellen mit iPS besser ausgebildete epitheliale Strukturen gegenüber Monokulturen entwickelten (Ono *et al.*, 2015). XIONG *et al.* präsentierte, dass eine Transplantation mittels Injektion von hADSZ in die Submandibularspeicheldrüsen von Ratten unmittelbar nach Bestrahlung zu einer verbesserten Speichelflussrate gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe führte. Es wurde eine morphologische Verbesserung in Form der Angiogenese, einer geringeren Apoptose

und reduzierten Fibroserate festgestellt. Zusätzlich zeigten immunhistochemische Untersuchungen eine Differenzierung in Azinus- und Duktalzellen einer kleineren Population von hADSZ (Xiong *et al.*, 2014). Die morphologischen Verbesserungen beruhen auf einem parakrinen Effekt, die durch bioaktive Lysate entstehen. Die Arbeitsgruppe um XIONG konnte erhöhte Level an mRNS von vaskulärem endotheliale Wachstumfaktor (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), Hepatozytenwachstumsfaktor (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) nachweisen. VEGF ist ein Gen für Wachstumsfaktoren, das maßgeblich an der Angiogenese beteiligt ist und eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Speicheldrüsen spielt. (Chen *et al.*, 2013). Neben einer immunmodulierenden Rolle wie das COX-2 Gen unterstützt HGF zusätzlich das Zellüberleben, die Geweberegeneration und unterdrückt die Fibrosebildung (Nakamura *et al.*, 2011). Neben den oben genannten Lysaten gibt es weitere Studien, die einen Effekt von weiteren bioaktiven Substanzen auf die Zellreparatur beschrieben.

LOMBAERT *et al.* beschrieben, dass die Gabe des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (engl. *granulozyte colony-stimulating factor*, G-CSF) Stammzellen des Knochenmarks mobilisieren kann, was zu einem größeren Gewicht der im Vorfeld bestrahlten Speicheldrüsen sowie zu einer Erhöhung der Azinuszellen und einer Besserung der Speichelflussrate führte (2006). Die beschriebenen Ergebnisse scheinen nach der Hypothese der Autorin am ehesten durch eine Zytokinausschüttung zu entstehen. Weder ein direkter Effekt von G-CSF auf Azinuszellen noch eine wesentliche Transdifferenzierung von Stammzellen konnte in der Studie nachgewiesen werden. Schließlich legten SUMITA *et al.* dar, dass Stammzellen aus dem Knochenmark, nach Transplantation, die Funktion von bestrahlten Speicheldrüsenzellen der Glandula parotis und submandibularis von Mäusen wiederherstellen können (2011). Neben der direkten Differenzierung der Spenderzellen zu epithelialen Speichelzellen wurde eine verbesserte Regeneration und eine erhöhte Dichte der mikrovaskulären Gefäße festgestellt, welche zu einer verbesserten Durchblutung führte. Der positive Einfluss auf die Heilung strahlengeschädigter Speicheldrüsen durch Sekretion bioaktiver Komponenten von hADSZ und Stammzellen des Knochenmarks konnte in Studien nachgewiesen werden. Aktuell bleibt der genaue Gehalt der bioaktiven Substanzen unklar.

### 1.2.3 Organersatz durch Tissue Engineering

Neben den hier vorgestellten Verfahren gibt es eine weitere Möglichkeit, die strahleninduzierte Hyposalivation und die daraus unmittelbar resultierenden schädlichen Folgen durch Organzüchtung (engl. *Tissue Engineering*) abzuschwächen, wenn nicht sogar aufzuheben. Gewebe wird entnommen, angezüchtet und reimplantiert. Das Verfahren selbst geht auf experimentelle Studien von SKALAK/FOX Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts zurück. Die Forscher bezeichneten mit dem Begriff Tissue Engineering zunächst nur ein chirurgisches Verfahren der Manipulation von Geweben und Organen (Skalak und Fox, 1988). Doch schon bald musste der Begriff um die allgemeine Verwendung von Biomaterialien ergänzt werden. Seitdem bezeichnet der Begriff nach der Definition von LANGER und VACANTI ein interdisziplinäres Feld, das die Prinzipien von Ingenieurs- und Lebenswissenschaften anwendet. Aus diesem fächerübergreifenden Ansatz wird biologisches Ersatzmaterial zur Wiederherstellung, Aufrechterhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion entwickelt (Langer und Vacanti, 1993).

Ausgangspunkt der Prozesse des Tissue Engineerings sind häufig Zellen oder Zellprodukte, die entweder von einem Spender oder vom Patienten selbst gewonnen werden. Je nach Methode kann es sich hier um mehr oder weniger differenzierte Zellen handeln (Griffith und Naughton, 2002).

Grundsätzlich werden verschiedene Möglichkeiten der praktischen Umsetzung unterschieden. Es besteht die Möglichkeit, *in vitro* amplifizierte Zellen direkt in die Umgebung geschädigten Gewebes zu injizieren. FERRARI und MAVILIO berichten von erfolgreichen Versuchen, bei denen aus dem Knochenmark isolierte und markierte Stammzellen nach intramuskulärer Injektion in Bereiche muskulärer Degeneration migrieren, dort zu Muskelgewebe ausdifferenzieren und an Regenerationsprozessen partizipieren (Ferrari und Mavilio, 2002).

Eine weitere Option besteht darin, die Zellen auf einer biologischen Trägersubstanz zu kultivieren und gemeinsam mit dieser einzubringen. So können größere Zellmengen strukturiert in das geschädigte Gewebe im Wirtsorganismus eingebracht werden (Griffith und Naughton, 2002).

Auch für das hier zu betrachtende Verfahren zur Wiederherstellung von Speicheldrüsengewebe beruhen die Vorteile auf dem Einsatz von körpereigenem Gewebe. So können etwaige Abstoßungsreaktionen minimiert werden. Bereits im Jahre 1993 einer Gruppe um DARDICK *et al.* gelang die Züchtung von Speicheldrüsenzellen (Dardick

et al., 1993). Aus Gewebe der humanen Ohrspeichel- und Unterkieferspeicheldrüse wurden nach 28 Tagen die unterschiedlichen Bestandteile einer Speicheldrüse immunhistologisch und elektronenmikroskopisch isoliert. Die Zellen wurden auf Kollagen-Gelen angezüchtet und mit Isoprotenerol behandelt. Für die vorliegende Arbeit ist eine Studie von JORAKU von besonderem Interesse. Er und sein Team wiesen nach, dass die Speicheldrüsenzellen, die auf Kollagen-Matrigel gezüchtet wurden, einen dreidimensionalen Aufbau zeigten. Ferner konnte er sowohl eine speicheldrüsenähnliche Formierung als auch Funktion präsentieren. Das Schlussleisten (engl. *Tight Junction*, *TJ*) Protein ZO 1 sowie TJ-assoziierte Proteine wie Occludin und Claudin konnten ebenfalls dargestellt werden. Diese Studie konnte zeigen, dass eine funktionelle und differenzierte Anzucht von Gängen und Acini aus einzelnen Speicheldrüsenzellen in einer dreidimensionalen Matrix *in vitro* möglich ist (Joraku et al., 2007).

Für die experimentelle Praxis bedeutet das, dass Tissue Engineering maßgebend von zwei Faktoren abhängen: Die verwendeten Zellen und das Trägermaterial. Die verwendeten Zellen ergeben sich aus dem jeweiligen Anwendungsgebiet. Auf dieser Basis erfolgt dann die Suche nach dem passenden Material. Sichtet man die wissenschaftlichen Arbeiten zum Thema Anzucht von Parotisgewebe, so findet man auf der einen Seite Trägermaterialien aus Bioelastomeren auf Polyurethanbasis und auf der anderen Seite Trägermaterialien, die auf Polyphosphazenen (Hydrogel) basieren (Joraku et al., 2005; Pradhan et al., 2010). Der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, dass ggf. auch Titan und Zemente zum Einsatz kommen könnten, die allerdings in der vorliegenden Untersuchung keine Rolle spielen.

Bioelastomere bieten den Vorteil, dass für ihren Einsatz als medizinisches Produkt über mehrere Jahrzehnte hinweg Erfahrungen gesammelt werden konnten. Prinzipiell lassen sich die Bioelastomere hinsichtlich ihres Ursprungs in drei Kategorien unterteilen:

1. natürlich gewonnene oder biosynthetische Bioelastomere
2. biosynthetische, abbaubare Polyester
3. chemisch synthetisch, abbaubare Elastomere

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Elastomeren der Kategorie 3 gearbeitet, die anhand ihres Hauptbestandteiles vereinfacht in die Gruppe der auf Polycaprolacton (PCL)-basierenden Polyurethane eingeordnet werden, siehe Abbildung 4. Zentrale Anforderungen an ein Bioelastomer sind, dass der Stoff bioresorbierbar und

hydrophil ist, eine bestimmte Abbauphase und mechanische Fähigkeiten wie Formstabilität, Ausdehnungsbegrenzung und einen niedrigeren Transformationspunkt als die Körpertemperatur aufweist.

Da dieses Trägermaterial langfristig im menschlichen Körper verbleiben soll, musste ausgeschlossen werden, dass es hier zu unerwünschten Nebenwirkungen kommt, wie z.B. Vergiftungserscheinungen, Thrombosen, Zellverletzungen, Entzündungen und/oder allergische Reaktionen (Yoda, 1998). Hierfür bot sich Polyurethan an, da das Material zum einen die geforderten Merkmale aufwies, zum anderen aber in seiner 3D-Form leicht an den jeweiligen Einsatzort angepasst werden konnte (Saad *et al.*, 1998).



**Abbildung 4:** Bild eines sterilen  $\epsilon$ -Ca-prolacton - Polyurethan-Schwämmchens mit beiliegendem Maßstab ( $\varnothing$  5 mm; Höhe 2 mm)

Um ein reproduzierbares Volumen zu erstellen wurde der Durchmesser von 5 mm mit einer Stanzbiopsie erzeugt, die Höhe von 2 mm wurde anhand eines Skalpell mit anliegendem Lineal bestimmt.

### 1.3 Wachstum und Migration von Zellen auf einer Trägersubstanz

Bevor zur praktischen Umsetzung der hier zum Experiment anstehenden Versuchsanordnung übergeleitet wird, sollen an dieser Stelle kurz die grundlegenden Prozesse der Geweberegeneration referiert werden. Dabei kommt dem Prozess der Zellmigration und des Zellwachstums eine zentrale Bedeutung zu.

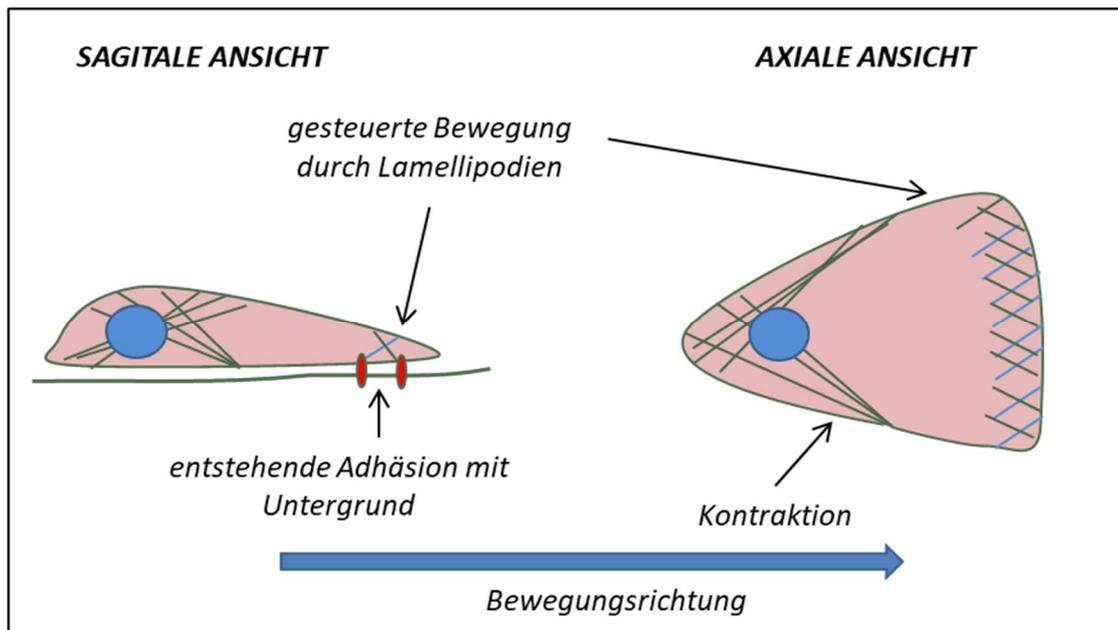
Die Zellen in einem lebenden Körper wandern als Reaktion auf bestimmte Stimuli, wie z. B. lösliche Lockstoffe, so genannte Chemotaxis, an oberflächengebundene Moleküle (Haptotaxis) und biophysikalische Kontakte (Durotaxis oder Mechanotaxis) (Cara *et al.*, 2001; Redd *et al.*, 2006). RAMON Y CAJAL stellte als Erster dar, wie anziehende Moleküle wachsende Axone in Ihrer Richtung führen können (Ramón y Cajal, 1892). Seitdem ist nachgewiesen, dass *In vivo*-Gradienten chemischer Signale existieren.

Die Zellbewegung spielt bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine zentrale Rolle, wie beispielsweise bei der Morphogenese, der Angiogenese, der Immunantwort, der Tumormetastasierung und der Wundheilung: Im Falle einer Hautverletzung beispielsweise wandern die Entzündungszellen und Fibroblasten in das vorübergehend entstandene Gerinnsel. Währenddessen kommt es zu einer Vermehrung und Wanderung der Hautzellen, um die Oberfläche wieder zu verschließen (Bradley *et al.*, 1999). Entsprechende Migrationsmechanismen wurden in ausführlichster Weise studiert.

## 1 Einleitung

Durch Fluoreszenz-Markierung kann die Zellmigration direkt *in vivo* dargestellt werden (Ahmed *et al.*, 2002).

Zellmigration ist ein komplexer Prozess, der eine Zusammenarbeit des Zytoskeletts, der Membran und Signalwegen erfordert.



**Abbildung 5: Schematische Zeichnung einer Zellmigration: Sagittale und axiale Ansicht einer Zelle.**

Vorwärtsbewegung einer Zelle durch Retraktion, hervorgerufen durch Ablösung des hinteren Zellbereichs. Eine wandernde Zelle führt im Inneren ihres Zellkörpers in präziser Reihenfolge entsprechende Schritte durch. Proteine der Rho-GTPasen steuern die Richtung der Wanderung durch Anheften der Lamellipodien im vorderen Bereich der Zelle. Daraus folgt eine Kontraktion des Zellkörpers, die sich bis auf die Rückseite der Zelle fortsetzt. Modifiziert nach Raftopoulou und Hall (2004).

Als Reaktion auf externe topographische oder chemische Reize ziehen sich die Zellen an ihrer führenden Zellgrenze voran (Abbildung 5).

Die Richtung der erweiterten aktiven Membran beinhaltet sowohl blattartige Vorsprünge (Lamellipodien) und spitze Vorsprünge (Filopodien), welche eine Anheftung und damit Zugkraft auf das Substrat erzeugen, wodurch eine Gegenkraft auf die Zellmigration entsteht (Mitchison und Cramer, 1996). Die Kontraktion der Zytoskelett-Filamente zieht den Zellkörper zum führenden Rand. Daraus entsteht eine Ablösung und damit eine Retraktion des hinteren Bereiches der Zelle, die sie dadurch vorwärtsbewegen lässt. All diese Schritte beinhalten einen Aufbau und Abbau der Zytoskelett-Filamente, insbesondere der Aktin-Filamente. Hierbei wird eine moderate Adhäsion durch die Trägermatrix hergestellt, welche wesentlich für eine dynamische Vorwärtsbewegung und Kontraktion der Zelle ist (Wu *et al.*, 2012).

### 1.4 Einflüsse der Biomaterialien mit molekularen Gradienten auf die Zellmigration und Geweberegeneration

Zellreaktionen wie Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Migration in Verbindung mit physikalischen und chemischen Reizen des Trägermaterials wurden schon in zahlreichen Untersuchungen getestet (Bhat *et al.*, 2005; Borkenhagen *et al.*, 1998; Maheshwari *et al.*, 2000). Dabei müssen zwei Gradienten getrennt voneinander untersucht werden: der physikalische Gradient auf der einen Seite, dem Eigenschaften wie die Art des Materials oder den strukturellen Aufbau zugeschrieben werden. Auf der anderen Seite der chemische Gradient, der sich auf den dreidimensionalen Aufbau der Materialien auswirkt, wie zum Beispiel die Dichte oder die eingebauten funktionellen chemischen Gruppen. Nicht zuletzt deshalb können schon sehr geringe Veränderungen eines an sich gleichen Materials, zu einer nachweisbaren Beeinflussung der Zellen führen.

Die Steifigkeit der Matrix hat einen großen Einfluss auf die Zelladhäsion und die Beweglichkeit. ZAARI *et al.* (2004) fanden heraus, dass Zellen, die sich mit einem starrem Substrat verbanden, ein besser definiertes Zytoskelett und Filamente aufwiesen. PELHAM/WANG bestätigten dies und wiesen darüber hinaus nach, dass die Zellen eine höhere Beweglichkeit und stärkere Aktivität zeigten, die auf weichen Untergrund sowie die gelockerte Zelladhäsion zurückzuführen war (Pelham und Wang, 1997). Daraus lässt sich ableiten, dass ein Steifigkeitsgefälle die Zellwanderung lenken kann. Dies wurde von WONG *et al.* bestätigt (Liang *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2003). In unterschiedlichen Studien wurde beobachtet, dass die Lage oder auch die Oberflächenbeschaffenheit Einfluss auf die Zellbewegung haben. Die Arbeitsgruppe um Kim erschufen eine Modellsubstanz mit einer anisotropischen mikro- und nanotopographischen Versuchsanordnung (Kim *et al.*, 2009).

Mit der Technik der UV-unterstützten Kapillarlithographie konnten lokale Dichteunterschiede erzeugt werden. Es wurde beobachtet, dass sich Fibroblasten an den dichteren Stellen anhefteten und an Erhöhungen ausgerichtet und ausgedehnt hatten. An den dichteverminderten Stellen kam es zu einer Abnahme der Zellstabilisierung und Minderung der Zellorientierung. Daraus resultierte eine Verlangsamung der Bewegungsgeschwindigkeit.

Neben den physikalischen gibt es auch chemische Gradienten. Wie bei den physikalischen Gradienten, z. B. bei Wachstumsfaktoren, können Extrazellulärmatrix (EZM)-Proteine, so genannte Signal-Moleküle, die Bewegungsrichtung beeinflussen. Die

EZM besteht aus der Gesamtheit aller Makromoleküle im Interzellularraum. Es handelt sich nicht um eine unstrukturierte Ansammlung von Makromolekülen im Zellzwischenraum, sondern um eine sehr komplexe Umgebung aus verschiedenen Fasern, die in eine Grundsubstanz eingebettet sind. Sie ist essentiell für die Verankerung der Zellen und die Formkonsistenz der Gewebe (Ayad *et al.*, 1986).

Eine Vielzahl chemischer Stoffe wurde entwickelt, um ihren Einfluss auf das Verhalten der Zellwanderung unter Laborbedingungen untersuchen zu können. Darunter waren künstlich hergestellte Polymere, die sich in ihrer Polarität, ihrer hydrophilen Eigenschaft, ihrer Oberflächenenergie, ihrer Ladung und sogar ihrer Biokompatibilität an unterschiedlichen Stellen der Trägermatrix unterschieden. Sie ließen sich noch einmal anhand ihrer Bindungsart differenzieren: Eine ist an die EZM gebunden, wie die Kategorie der Hormone oder Wachstumsfaktoren (Jones und Smith, 1998). Die andere Kategorie ist frei löslich, wie die zur Ernährung dienenden Biomoleküle. Ihre Verteilung vollzieht sich nach dem Gesetz der großen Moleküle durch Konvektion und Diffusion (Swartz und Fleury, 2007). Für das zu erzeugende Material bedeutet das, dass in ihm Moleküle, die an das Substrat gebunden sind und Moleküle, die sich frei löslich durch Diffusion im Raum befinden, enthalten sein müssen.

All diese Faktoren haben zwar einen Einfluss auf die Zelladhäsion, Ausbreitung und Vermehrung, jedoch können sie nur indirekt auf die Richtung der Zellbewegung Einfluss nehmen.

### **1.4.1 Zellmigration auf einer dreidimensionalen Matrix und mögliche Anwendungen in der Geweberegeneration**

Inzwischen existieren jedoch auch Studien, in denen es gelang, das Verhalten der Zellbewegung auf dreidimensionalen Matrices und Hydrogelen nachzuweisen. DODLA/BELLAMKONDA verteilten dorsales Ratten Ganglion (DRG) in Agarosegelen. Mittels Crosslinking und einer chemischen photoreaktiven Gruppe konnte durch UV-Licht ein Laminin-Gefälle in den Gelen isoliert werden. Dieses Gefälle führte zu einer stärkeren Wachstumsrate der Neuronen (Dodla und Bellamkonda, 2006). TAMPIERI *et al.* implantierten Keramik-Matrices, die ein Gefälle bezüglich der Porosität aufwiesen, in einen Defekt eines Hasenfemur (Tampieri *et al.*, 2001). Bei diesem Versuch konnten neue Knochenstrukturen in den Bereichen beobachtet werden, die eine höhere Porosität aufwiesen. Die Arbeitsgruppe unter der Leitung von ROY benutzten Trägermaterialien, die aus einer Polymer-Keramik-Mischung bestanden und ebenfalls

einen Gradienten bezüglich der Porengröße zeigten. Diese wurden in die Kalotte eines Kaninchens eingesetzt (Roy *et al.*, 2003). Auch hier konnte belegt werden, dass die Bereiche mit einer höheren Porosität bessere Wachstumsbedingungen für Knochen aufwiesen als die Bereiche mit einer geringeren Durchlässigkeit. Eine Arbeitsgruppe unter der Leitung von HOFMANN stellte fest, dass Seiden-Matrices mit einem Gradienten der Porosität die Formierung von Geweben mit ausgerichteter Zellstruktur unterstützen (Hofmann *et al.*, 2007).

### 1.5 Ziel der Arbeit

Die Generierung einer artifiziellen Kopfspeicheldrüse ist Gegenstand von Forschungsbemühungen. Im vorliegenden Projekt soll eruiert werden, ob humanes natives Speicheldrüsengewebe der Glandula Parotis auf dreidimensional aufgebautem, gradientenfreiem Polyurethan auf  $\epsilon$ -Caprolacton-Basis zum Wachstum und Aufrechterhaltung der Funktionalität angeregt werden kann.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit bündelt eine breite Palette von Überlegungen:

- Welche Zellen der humanen Ohrspeicheldrüse sollten zur Untersuchung herangezogen werden und wie ist ihre Vitalität?
- Welche Eigenschaften muss ein Kunststoff aufweisen, der implantiert wird und ein Zellwachstum gewährleisten soll?
- Wie kann die Zell-Funktionalität der besiedelten Konstrukte nachgewiesen werden?
- Welche Komplikationen können in der Kultivierung und Passage der humanen Speicheldrüsen in der Herstellung und Lagerung des Trägermaterials auftreten?
- Gibt es limitierende Faktoren, die die Vitalität, Adhäsion und die Funktionalität der Zellen auf der besiedelten Matrix beeinträchtigen?

Die Beantwortung dieser Fragen soll einen Beitrag für eine durch Tissue Engineering hergestellte Ersatzspeicheldrüse darstellen.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

Zur Anzüchtung des Ohrspeicheldrüsengewebes diente natives, rekultiviertes Gewebe humaner Parotisdrüsen. Als Testmethoden kamen ELISA und immunhistologische Färbungen zur Bestimmung der fortdauernden Funktionalität wie auch der Proliferation zum Einsatz.

### **2.1 Probanden und Patienten**

Das Gewebe der Ohrspeicheldrüsen stammt von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Dr. h. c. R. Hagen), die im Zeitraum von Oktober 2010 bis Juli 2013 zur Entfernung von gutartigen Tumoren der Ohrspeicheldrüse routinemäßig operiert wurden. Alle Patienten wurden nach Vorgaben des Ethikkommissionsantrages (Nr. 16/06) des Universitätsklinikums Würzburg mündlich und schriftlich über die Verwendung ihres Gewebes im Sinne der Wissenschaft informiert und das Einverständnis wurde eingeholt.

Das verwendete Parotidgewebe wurde von 20 Patienten im Alter von 42 bis 90 Jahren gewonnen. Weitere Patienteneigenschaften sind tabellarisch im Ergebnisteil dargestellt.

### **2.2 Gewinnung der Ohrspeicheldrüsenzellen**

Nach Beendigung des operativen Eingriffs wurde das Parotidgewebe in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl Carl Roth, Karlsruhe, D) aus dem Operationssaal in das Labor übergeben und dort rasch unter laborhygienischen Maßgaben einer Sterilbank zur weiteren Verarbeitung aufbereitet. In einer Gewebskulturschale wurde mit einem Einmal-Skalpell (FEATHER Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan) das Gewebe der Ohrspeicheldrüse von Bindegewebe befreit und in 1 mm x 1 mm x 1 mm große Gewebeteile aufgetrennt. Das Gewebe befand sich während der Bearbeitung in einem Dulbecco-modifiziertem Eagle (DME)-Medium (Gibco®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, D). Es enthielt ein Prozent Fungizone und ein Prozent Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom AG, Berlin, D).

Der nun folgende Arbeitsschritt bestand darin, das Gewebe auf eine Zellkulturplatte

## 2 **Material und Methoden**

---

(24-Well-Platte, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) zu transportieren. Es wurden jeweils 400 ml Bronchial Epithel Growth (BEG)-Medium (Promo Cell, Heidelberg, D) zuzüglich ein Prozent Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom AG) hinzugefügt, um sogenannte „Mini-Organokulturen“ (MOKs) heranzuzüchten. Vorbild waren die Untersuchungen von KLEINSASSER *et al.*, die nachweisen konnten, dass MOKs ein sinnvolles Modell ist, um eine *in vivo* Situation nachzubilden (Kleinsasser *et al.*, 2001; Kleinsasser *et al.*, 2004).

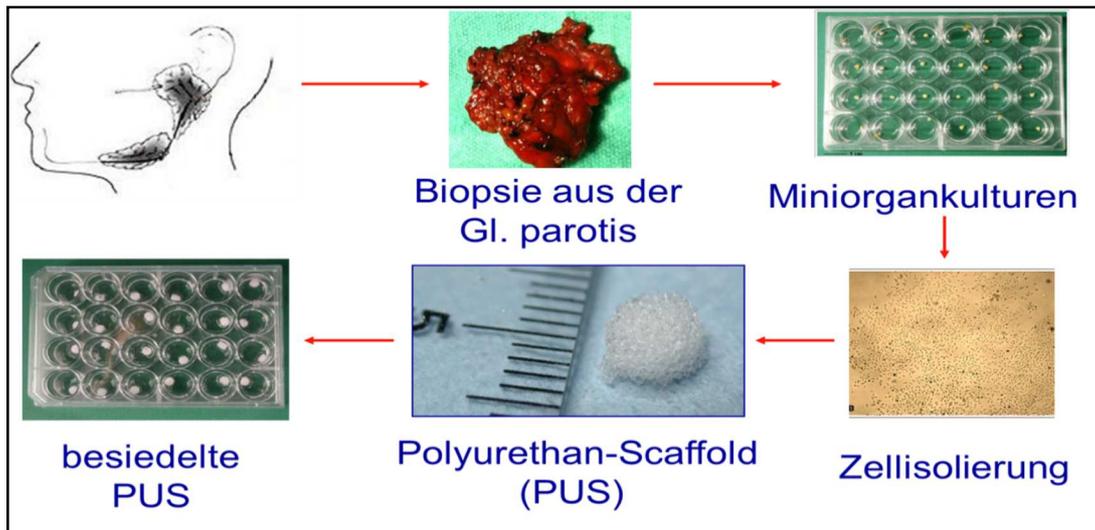
Um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde alle zwei Tage ein Austausch des Mediums vorgenommen. Zur Sicherstellung von stabilen äußeren Bedingungen wurden die Kulturplatten in einem Inkubator (CO<sub>2</sub> Inkubator NU5500E, NuAire Inc., Plymouth, MA, USA) mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 37°C bebrütet.

Nach einer Zeitdauer von 10-14 Tagen konnte eine nahezu komplette Konfluenz an der Bodenplatte durch adhärente primäre Zellen beobachtet werden. Der nächste Arbeitsschritt bestand im Ablösen dieser Monolayerkultur und dem Überführen in Zellkulturflaschen. Die Abtrennung wurde unter Hinzugabe von 250 µl der Peptidase 2,5%iges Trypsin (Gibco®, life technologies™ GmbH) mit einer Einwirkzeit von 5 – 7 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erreicht. Durch den Einsatz des Enzyms Trypsin wurden die Proteine außerhalb der Zellen aufgespalten, sodass die Zellen ihre Haftung am Untergrund verloren. Unter Hinzugabe von Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-Medium, Gibco®, life technologies™ GmbH) mit einem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS, Linaris, Wertheim-Bettingen, D) wurde dieser Prozessschritt beendet.

Die so entstandene Suspension wurde nun in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) übertragen und für 7 min bei 1.000 *revolutions per minute* (rpm) zentrifugiert. Hierfür wurde eine Zentrifuge Typ 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, D) verwendet. Es kam dabei zu einer Trennung der flüssigen und bodenständigen festen Bestandteile der Suspension. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, sodass einzig die Feststoffe, bestehend aus den abgelösten Parotiszellen, übrigblieben. Anschließend mussten die Zellen unter Hinzugabe vom BEG-Medium mit 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung wieder gelöst werden. Nach darauffolgender Zählung und Vitalitätsbestimmung mittels einer Neubauer-Zählkammer (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D) in Kombination mit einem Trypanblau-Ausschlusstest, wurden die gelösten Zellen gleichmäßig auf Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) mit einer Größe 25 cm<sup>2</sup>

## 2 Material und Methoden

verteilt. Der Wechsel des Mediums wurde alle 2 Tage vorgenommen.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus**

Nach Biopsie der Glandula parotis wurde diese im Labor der HNO zu Miniorgankulturen verarbeitet. Anschließend folgte die Zellisolierung der Parotiszellen. Bei Erreichen der gewünschten Zellzahlen wurden sie auf eine Polyurethan-Matrix übertragen und dann in einer 24-Lochplatte mit Nährmedium versorgt. Zu den Untersuchungstagen 7, 14 und 21 wurden diese dann entnommen und zur weiteren Untersuchung konserviert.

Die rundlichen klaren Strukturen sind lebende Parotiszellen, die bläulich angefärbten, markierten avitale Zellen (Pfeil). Im Hintergrund schimmern waagrechte und senkrechte Striche durch. Diese geben die einzelnen Quadranten vor, die zur Zellzählung bestimmt sind.

Nach dem Erreichen einer Konfluenz von etwa 70 Prozent wurden die adhärenenten Zellen zum zweiten Mal passagiert und in neue Zellkulturflaschen bis zu einer maximalen Größe von 175 mm<sup>2</sup> übertragen. Nach Erreichen der Zellzahl von mindestens 5 x 10<sup>6</sup> Zellen, was einer Kultivierung von etwa 4 Passagen entspricht, konnten die Matrices mit etwa 500.000 Zellen besiedelt werden. Der Versuchsaufbau ist in der Abbildung 6 schematisch dargestellt. Das abgetrennte Bindegewebe wurde zur Gewinnung von Fibroblasten nach dem gleichen hier erläuterten Protokoll verwendet, um in der Immunfluoreszenz als Negativkontrolle zu dienen.

### 2.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die genaue Anzahl der Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl der verdünnten Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer (Invitrogen life technologies™, Karlsruhe, D) hinzugegeben. Die runden, lebenden Parotiszellen wurden nun in vier Quadranten eingeteilt und gezählt. Die Summe der Zellen wurde mit folgender Formel berechnet:

## 2 Material und Methoden

Formel 1:

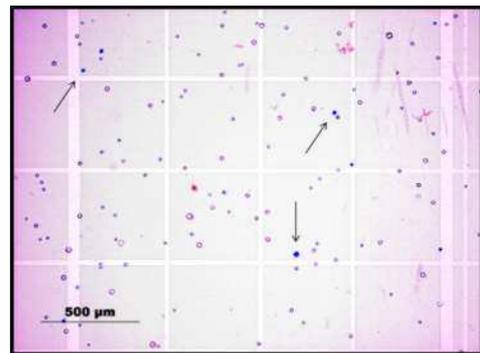
$$\text{vitale Zellen pro ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times 10^4 \times \text{ml Verdünnung}$$

Nachfolgend ging es um die Überprüfung der Zellvitalität mit Hilfe der Trypanblau-Färbung. Dabei handelt es sich um ein bewährtes Verfahren zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Zellen. Sie basiert auf dem Prinzip, dass bei lebenden Zellen bestimmte Farbstoffe nicht ins Zellinnere gelangen, während sich tote Zellen anfärben lassen. Dadurch können vitale Zellen selektiv und deutlich unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden (Strober, 1997). In vorliegendem Fall wurde die Vitalität durch die Anfärbung mit Trypanblau - Lösung (0,5 % (w/v) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, D) geprüft.

Weil der Farbstoff ausschließlich von abgestorbenen oder perforierten Zellen aufgenommen wird, ist mit diesem Verfahren eine klare Trennung zwischen vitalen, durchscheinenden und avitalen, tiefblauen Zellen möglich (siehe Abbildung 7).

Die Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen war die Vitalität der Zellen. So wurde neben der o. g. Möglichkeit der Vitalfärbung durch Trypanblau auch die Technik mit Fluorescein-Diacetat-Ethidiumbromid herangezogen. Die Lösung wurde aus 15 µl Fluoresceindiacetat (FDA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D), 2,5 ml PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Roche Diagnostics, Mannheim, D) und 30 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) (EB, A. Hartenstein GmbH, D) jeweils neu vor dem Gebrauch zubereitet.

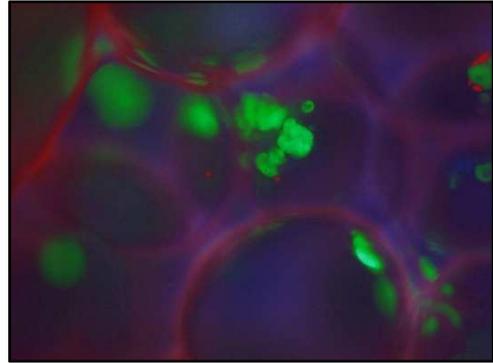
Das Gemisch wurde mit einer Aluminiumfolie (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) umhüllt, um eine Reaktion mit Licht zu vermeiden. Mit dem Gemisch wurden die Konstrukte bedeckt, die in eine 24-Well-Platte übertragen wurden. Im Anschluss wurden die Präparate mit dem Programm LAS V 3.7 für das Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 4000 B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D) unter abgedunkelten Bedingungen ausgewertet. Die grüne Färbung entsteht in vitalen Zellen durch einen enzymatischen Abbau



**Abbildung 7: Typisches Bild einer Vitalfärbung**

Die rundlichen klaren Strukturen sind lebende Parotiszellen, die bläulich angefärbten, markierten avitale Zellen (Pfeil). Im Hintergrund schimmern waagrechte und senkrechte Striche durch. Diese geben die einzelnen Quadranten vor, die zur Zellzählung bestimmt sind.

von FDA zu einem grün fluoreszierenden Metaboliten. Ethidiumbromid gelangt durch Membranschäden in die Zelle und führt durch Interkalation mit Nukleinsäuren zu einer Rotfärbung. Für die Lebendfärbung mit FDA wird ein blauer Lichtfilter mit einer typischen Wellenlänge von 450-490 nm Wellenlänge, für die Totfärbung durch Ethidiumbromid ein grüner Lichtfilter mit 520-560 nm Wellenlänge verwendet. Werden die beiden Bilder fusioniert, zeigt sich folgendes Gesamtbild (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Overlay der FDA/EB-Vitalfärbung**

*in vitro* gezüchtete humane Parotiszellen auf einer PUR-Matrix. Dargestellt sind vitale, grün fluoreszierende Zellen und avitale, rot-fluoreszierende Zellen.

### 2.4 Vorbereitung des Trägermaterials Polyurethan

Als Trägermaterial wurde ein auf Polycaprolactondiol und -triol (PEG-PPG-PEG), Dextrose und Trethanolamin basierendes Polyurethan (AP1970C) der Firma PolyMaterials AG, Kaufbeuren) verwendet (Wiese und Maier, 2006).

Um den Kunststoff weiter bearbeiten zu können, wurde er in einem ersten Verarbeitungsschritt in flüssigen Stickstoff getaucht. Durch die Kühlung bei -196 Grad Celsius (77 Grad Kelvin) nahm die Elastizität des Materials kurzfristig so stark ab, dass es in Scheiben geschnitten werden konnte.

Die Stärke musste so angepasst werden, dass man mit einer Biopsie-Stanze (Harris Uni-Core™, Redding, C.A., USA) die entsprechend



**Abbildung 9: Herstellung der Polyurethan-Matrix**

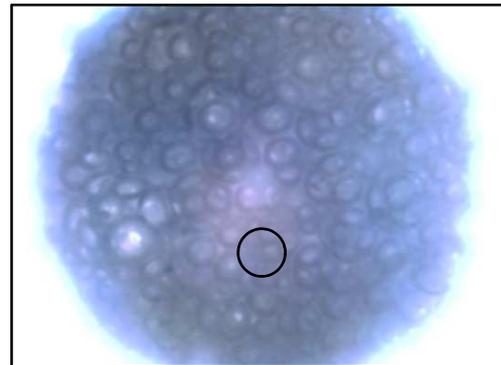
In der linken oberen Ecke erkennt man 18 Exemplare der ausgestanzten Matrices. In der rechten oberen Ecke sieht man das PUR Schaumstück.

kreisrunden Matrices ausschneiden konnte (Abbildung 9). Schaumrückstände, die über die Höhe hinausragten, wurden mit einem Einmalskalpell abgetragen. Das weitere Vorgehen diente der Gewinnung der eigentlichen Matrices: Mit einer Derma Punch Stanze Durchmesser 5 mm wurden aus dem heruntergekühlten Block mehrere Zylinder herausgestanzt. Diese wurden nun in mehrere Segmente mit einer Höhe von 2 mm unterteilt und in einem weiteren Schritt im flüssigen Medium PBS autoklaviert. Diese PUR-Matrices dienten dann als Träger der Parotiszellen. Um ein hohes Maß an Sterilität zu gewährleisten, wurden die einzelnen Matrices 5 Minuten in 70-prozentigen Alkohol eingelegt und danach dreimal in PBS gewaschen.

Aus eigenen Voruntersuchungen zur optimalen Lagerung der Polyurethan-Matrix war bekannt, dass eine längere Aufbewahrung in PBS über sechs Wochen zu einer Vergrößerung der Schwämmchen führte. Darüber hinaus waren Ablösungen in der Flüssigkeit zu beobachten. Wie sich diese Änderung auf den chemischen Zusammenbau des Stoffes, insbesondere der Hydrophilität auswirkt, ist nur zu vermuten. Diese Beobachtungen führten dazu, dass für die Studie die Matrices erst kurz vor ihrer Verwendung aus den Kunststoffscheiben herausgestanzt wurden und dann im flüssigen Medium PBS autoklaviert wurden. Pro verwendeter Scheibe konnte nur eine definierte Anzahl von Matrices erzeugt werden. Um eine möglichst hohe chemische Stabilität des Produkts zu bewahren, empfahl der Hersteller, das mit Alufolie umwickelte Material möglichst trocken und kühl bis zur Verwendung zu lagern. Dieser Empfehlung wurde in der Erstellung der unbesiedelten Matrices gefolgt.

### 2.5 Übertragung der Parotiszellen auf die Matrices

Die adhärennten Parotiszellen wurden mittels Trypsinierung von den Oberflächen der Kulturflaschen abgelöst und temporär in RPMI-Medium zur weiteren Verarbeitung verwahrt. Um bei der Übertragung der Zellen auf den  $\epsilon$ -Caprolacton-Kunststoff eine ausreichende Adhäsion zu gewährleisten, wurden diese mit einem Zweikomponentenkleber aus einer Kleberproteinlösung aufgetragen. Zuerst wurde auf die PUR-Matrix die Thrombinlösung mit einer Mikropipette aufgebracht. Nach Vereinigung der Kleberproteinlösung und der Zellsuspension wurde diese nun zusätzlich auf die Matrix pipettiert. Nach wenigen Minuten vollzogen sich die Vermischung der zwei Komponenten und die Bildung des Fibrin-Netzes. Die Gerinnbarkeit des verwendeten Fibrins war dabei größer als 90 Prozent. Die Geschwindigkeit der Fibrinbildung hängt bekanntermaßen von der Thrombinkonzentration ab. In der Praxis haben sich relativ hohe Konzentrationen (500 IE Thrombin) bewährt. Die Konstrukte mit der Zellsuspension wurden im letzten Schritt 30 min im Brutschrank bei 37 Grad Celsius ausgehärtet und nach dieser Zeit mit 400 ml RPMI zum Zwecke der Ernährung der Zellen versorgt.



**Abbildung 10: Polyurethan-Matrix in 2,5-facher Vergrößerung**

Durch die hohe Dichte des Materials ließen sich lediglich die unteren Poren-Schichten unter dem Licht-Mikroskop abbilden. Diese stellen sich wie Luftblasen auf der Abbildung dar und lassen hier ihre nahezu kreisrunde Formation erkennen. Die gelblich schimmernden Stellen (Kreis) sind Zellen mit der Kleberproteinlösung und der Thrombinlösung.

Nach ca. 24 Stunden ließ sich unter einem Licht-Mikroskop überprüfen, ob es zum Anheften der Zellen auf dem Polyurethan kam (siehe Abbildung 10). Die Bestandteile des Klebers sind dem letzten Teil der Gerinnungsreaktion des menschlichen Körpers nachempfunden. Das Thrombin führt nach Zusammenführen der beiden Teile zu einer Spaltung des Fibrinogens zu Fibrin. Schließlich folgte die Aktivierung des ebenfalls vorhandenen Gerinnungsfaktors XIII zu Faktor XIIIa. Der aktivierte Faktor löste eine Quervernetzung des Fibrins aus. Das Ergebnis dieser Reaktionen war die Entstehung eines stabilen, zähelastischen Netzes.

### **2.6 Histologische Praktiken und Untersuchungen**

In diesem Kapitel werden die Vorgänge des Anfertigen von Gefrier- und Paraffinschnitten sowie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung - gleichfalls getrennt nach Gefrier- und Paraffinschnitten - dargelegt. Danach wird der Sandwich-ELISA/EIA zum  $\alpha$ -Amylasenachweis beschrieben.

Zum Zweck der Proliferation der Parotiszellen wurden die Präparate nach 7, 14 und 21 Tagen aus den Wellplatten entnommen und konserviert. Dabei wurden mehrere Schwämmchen eines Patienten genutzt. Um ausreichend dünne und auch gleichmäßige Schnitte der besiedelten Proben herstellen zu können, wurden Gefrierschnitte und Paraffinschnitte verwendet.

Für die Anfertigung der Gefrierschnitte boten sich immunhistologische und enzymhistochemische Färbungen an. Denn im Gegensatz zur Einbettung in Paraffin enthielten die Gefrierschnitte keine fettlösenden Substanzen. Im Einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen: Die Konstrukte aus dem Nährmedium wurden entnommen. Zur Reinigung von löslichen Bestandteilen wurden die Präparate 3-malig in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben in 4-prozentiges Paraformaldehyd (PFA) eingebettet und mindestens vier Stunden in Rollrandgefäßen (A. Hartenstein GmbH) auf den Rüttler gegeben (Schüttelinkubator, Thermomixer comfort, Eppendorf AG). Dies führte zu einer Fixierung der Matrix und einer irreversiblen Vernetzung der Proteine. Dadurch konnte die Struktur der Zellverbände erhalten werden. Danach wurde die PFA-Lösung abgesaugt und gegen eine 20-prozentige Glucose-Natrium-Phosphat-Lösung getauscht. Auch diese Lösung wurde in aufsteigender Konzentration in 5-prozentigen Schritten auftitriert, bis eine Glucose-Sättigung von 60 Prozent erreicht wurde. Anschließend war eine Ruhezeit von mindestens 24 Stunden einzuhalten. Am nächsten Tag wurde die 60-prozentige Glucoselösung gründlich entfernt und durch Tissue-Tec

## 2 *Material und Methoden*

---

O.C.T (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL) ersetzt. Zur Aufbewahrung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff bei -80 Grad Celsius schockgefroren.

Um die Präparate weiterverarbeiten zu können, wurden diese vorsichtig durch Übertragung in eine Kühltruhe auf eine Temperatur von -20 Grad Celsius gebracht. Dies war die angemessene Temperatur, die gewährleistete, dass exakte Schnitte erzielt werden konnten. Die in Tissue-Tec konservierte Probe wurde anschließend im Kryostat abgelegt. Im nächsten Schritt wurde die Probe mit Tissue-Tec O.C.T auf einen der beiden metallischen Schneideblöcke angefroren. Um eine ausreichende Festigkeit zum Schneiden zu erreichen, musste die Probe 10 Minuten im Objekthalter ohne Berührung verbleiben. Die gefrorene Schicht aus O.C.T, die das Präparat umgab, wurde mit Schnitten von 50 µm Stärke entfernt, so dass die fertigen Schnitte auf eine Schichtdicke von 10µm kamen.

Neben den Gefrierschnitten erfolgte die alternative Einbettung der Proben in Paraffin sowie die Anfertigung der Paraffinschnitte. Zunächst wurden die Konstrukte aus der Wellplatte entnommen und dreimal in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben in eine vierprozentige PFA-Lösung getaucht, wo sie mindestens vier Stunden in Rollrandgefäßen auf dem Rüttler gemischt wurden. Danach wurden die in PFA fixierten Proben in Einbettkassetten verbracht und in Filterpapier für 2 Stunden in reinem Leitungswasser gewässert. Für die anschließende Entwässerung der Proben diente eine Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration, die über mehrere Stunden andauerte. Bei Raumtemperatur wurde der Alkohol schrittweise gegen Xylol ausgetauscht, bevor die Integration in Paraffin erfolgte. Die besiedelten Schwämmchen wurden nun in heißes Wachs getaucht und in metallischen Gießschälchen ausgekühlt. Nach Erhärtung lag der fertige Paraffinblock vor und konnte nun aus dem Metallschälchen entnommen werden.

Das Schneiden der Paraffinblöcke wurde mit einem Rotationsmikrotom RM 2255 (Leica Microsystems GmbH) durchgeführt. Dazu wurden die ausgehärteten Blöcke auf dem vertikalen mobilen Probenhalter fixiert und Schnitte von 3 µm vorgenommen. Die einzelnen Paraffinschnitte wurden nun sehr vorsichtig mit einer Pinzette in ein Wasserbad mit kaltem Wasser gebracht. Von dort wurden die Schnitte mit sauberen, fettfreien Superfrost-Objektträgern aufgenommen und in ein zweites Wasserbad (Julabo U37A, A. Hartenstein GmbH) mit 50°C warmen Wasser übertragen, ein Vorgang, der zur Streckung der Schnitte diente. Es folgte die Einsortierung der Schnitte zum Trocknen in Einmalplastikkästen bei 37 Grad Celsius im Inkubator (CO2 Incubator BBD 6220

Heraeus, Hanau, D).

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine dichromatische Einfärbungsmethode, die sich aus einem Farbstoff für den Zellkern (Hämatoxylin) und einem Farbstoff für das Zytoplasma (Eosin) zusammensetzt. Hämatoxylin ist ein kationischer oder basischer Farbstoff, der eine Affinität zu negativ geladenen (d. h. anionischen oder sauren) Zellbestandteilen hat, die auch als basophil bezeichnet werden. Er färbt insbesondere die Zellkerne blau/violett und bindet an den Nucleinsäuren. Eosin ist im Gegensatz dazu ein anionischer oder saurer Farbstoff, der eine Affinität zu positiv geladenen (d. h. kationischen oder basischen) Zellbestandteilen hat, die auch als eosinophil bezeichnet werden. Er färbt das Zytoplasma rosa und andere basische Zellbestandteile je nach dem Grad ihrer Acidophilie stärker rosa/rot. Das Wirkprinzip der unterschiedlichen Farbdarstellung basiert auf der sogenannten Elektroabsorption. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur Änderung der Absorptionseigenschaften als Antwort auf ein elektrisches Feld.

Eiweiße reagieren aufgrund ihrer chemischen Struktur als sogenannte Ampholyte. Entsprechend dem pH-Wert der Umgebung werden sie als Protonenakzeptor oder als Protonendonator verwendet. Liegt der pH-Wert unter dem isoelektrischen Punkt, so kommt es zu einer Aufnahme des Wasserstoffatoms. Liegt der pH-Wert der Umgebung über dem isoelektrischen Punkt, kommt es zu einer Abspaltung des Wasserstoffatoms und dementsprechend zur negativen Ladung. Gibt man einen basischen Farbstoff hinzu, werden Salze ausgebildet. Da sich die isoelektrischen Punkte des Zytoplasmas (~ 6,5) und der Zellkerne (~3,8) unterscheiden, wird diese Gesetzmäßigkeit für die Anfärbung genutzt. Bei einem basischen Farbstoff, dessen PH-Wert zwischen 6,5 und 3,8 liegt, werden allein die Zellkerne angefärbt, da nur diese eine negative Ladung aufweisen. Zur Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Proben für drei Minuten in Hämatoxylin gelegt. H-E-Färbungen an Kryo-Schnitten besitzen gegenüber Wachs-Schnitten den Vorteil, dass keine Rehydrierung des Gewebes vorgenommen werden muss. Die Schnitte wurden nun fünf Minuten lang mit destilliertem Wasser behandelt. Die hierbei entstehende rötlich-braune Färbung weist auf die Existenz der Zellkerne hin. Im darauffolgenden Schritt wurde die Küvette mit den Objektträgern ca. 10 Minuten unter laufendes Wasser gestellt. Dieser Vorgang, der auch als Bläuen bezeichnet wird, führte zu einer Erhöhung des pH-Wertes, der durch die typische blau-violette Färbung nachgewiesen wurde. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Objekte für zwei Minuten in verdünntes Eosin gelegt. Das Zytoplasma färbte sich daraufhin rot –

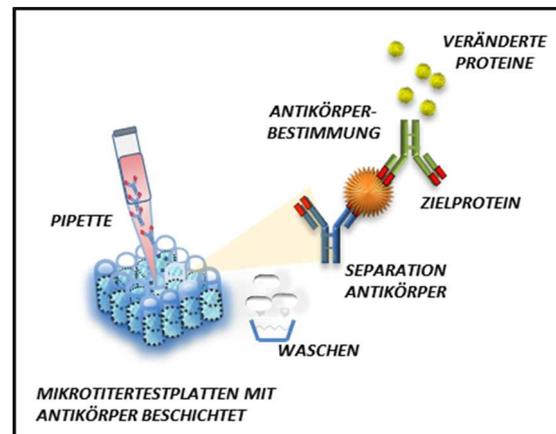
## 2 Material und Methoden

ein erwünschter Effekt, um den Zellkern von den übrigen Zellbestandteilen unterscheiden zu können. Die Proben wurden dann jeweils für zwei Minuten in 95- bzw. 100-prozentigen Alkohol gegeben, um die Schnitte zu dehydrieren. Nun erfolgte die Fixierung der Schnitte durch Hinzufügung von Entellan (Firma Merck, Darmstadt, D) und die Aufbewahrung in einem dünnen, verschlossenen Deckglas.

Nun wurde die Färbung der Paraffin-Schnitte in Angriff genommen. Zur Rehydrierung wurden sie zweimal für 15 min in Xylol gestellt und dann jeweils zwei Minuten in eine absteigende Alkoholreihe übertragen. Danach wurden die Schnitte in vollentsalztem Wasser geschwenkt, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar waren. Nachdem die Objekte für acht Minuten in einer Hämalaun-Lösung verblieben, wurden die Schnitte unter schwach fließendes VE-Wasser gehalten, bis keine Auswaschung der Farbe mehr zu beobachten war. Es folgte ein kurzes Eintauchen der aufgezogenen Objektträger in HCl-Alkohol, der durch Spülen mit VE-Wasser wieder entfernt wurde. Das Bläuen der Proben wurde mit Leitungswasser vorgenommen. Darauffolgend wurde zur Färbung des zytoplasmatischen und extrazellulären Anteils eine 1-prozentige Eosin-Lösung benutzt. Die Einwirkzeit betrug hier eine Minute. Nach dem Färben wurden die Proben unter schwach fließendes VE-Wasser gehalten, um überschüssiges Eosin zu entfernen.

Daraufhin folgte der sogenannte Sandwich-ELISA-Test (Abbildung 11). Er wird immer dort angewandt, wo  $\alpha$ -Amylase, ein spezifisches Enzym im Speichel der Parotis, nachgewiesen werden muss. Eingesetzt wird das *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Enzymgekoppelter Immunsorptionstest), wenn Stoffe (Antigene) mit einer spezifischen Oberflächenstruktur nachgewiesen werden sollen. Der Nachweis funktioniert bei einer Stoffgröße von wenigen nm. Die Bezeichnung Sandwich-ELISA-Test leitet sich von der Art ab, wie sich die beiden dabei eingesetzten Antikörper an das nachzuweisende Antigen anlagern.

Das antikörperbasierte Nachweisverfahren gehört, wie auch das Radioimmunassay



**Abbildung 11: Sandwich-ELISA Test**

Mit einer Pipette wird eine Probe in Mikrotiterplatten eingebracht, die mit Antikörpern gegen das zu bestimmende Antigen beschichtet sind. Der Versuchsansatz wird gewaschen und ein Antikörper hinzugefügt, an den ein Enzym gekoppelt ist. Ein sekundärer Antikörper wird gebildet. Das gebundene Enzym ist in der Lage, einen hinzugefügten Farbstoff durch Spaltung zu aktivieren.

(RIA), zur Gruppe der Immunassay-Verfahren. Es basiert aber nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbreaktion und gehört somit zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (engl. *enzyme immunoassay*, EIA). Anstatt eines Enzym-gekoppelten Detektionsantikörpers wird als Signalverstärkung eine Kombination aus zwei Antikörpern benutzt. Diese besteht aus einem ungekoppelten Detektions-Antikörper und einem zusätzlichen, dritten, sekundären Antikörper. Sekundär, weil es ein Antikörper gegen Antikörper ist, engl. *secondary antibody*, an den ein Enzym gebunden wurde. Das Nachweisverfahren mit dem sekundären Antikörper gestaltet sich gegenüber dem Enzym-gekoppelten Detektionsantikörper arbeitsintensiver. Die Verwendung eines sekundären Antikörperkonjugats hat jedoch den Vorteil, dass die kostenaufwändige Herstellung vieler verschiedener Enzym-gekoppelter Primärantikörper, die nur für jeweils ein Antigen spezifisch sind, umgangen werden kann. Die verwendeten sekundären Enzym-gekoppelten Antikörper, die als polyklonale Antikörper gleichzeitig an verschiedene Epitope in der konstanten Region (Fc-Region) von allen Erstantikörpern einer Spezies binden können, sind erheblich breiter einsetzbar und führen zu einer Signalverstärkung. Zudem können Sekundärantikörper-Enzym-Konjugate aufgrund der Spezifität für Fc-Regionen eines Antikörpersubtyps von einer Spezies für eine Vielzahl unterschiedlicher Immunassays verwendet werden, sodass es sich bei dem Sekundärantikörper um ein kostengünstigeres industrielles Massenfertigungsprodukt handelt (Lequin, 2005).

In der vorliegenden Untersuchung diente der Sandwich-ELISA-Test dazu, die  $\alpha$ -Amylase, ein spezifisches Enzym im Speichel der Parotis, nachzuweisen. Speziell ging es dabei darum, zu explorieren, wie sich die beiden dabei eingesetzten Antikörper an das nachzuweisende Antigen anlagern.

In der Praxis wurden spezielle Mikropipettierplatten mit einem der beiden Antikörper, dem sogenannten Beschichtungs-Antikörper, überzogen. Dafür wurde die zur Analyse anstehende Probe zunächst pipettiert und anschließend inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationsphase wurde die Platte gespült, um ungebundene Teile zu entfernen. Lediglich die gebundenen Antigene verblieben im Well (siehe Sandwich-Elisa Test). Nun folgte die Verabreichung des Detektions-Antikörpers, der mit seinem Fc-Fragment an das Enzym Meerrettichperoxidase gebunden ist. Daraus entstand die typische namensgebende Sandwich-Formation (Antikörper - Antigen - Antikörper). Ein erneutes Waschen der Well-Platte diente dazu, überschüssige Antikörper von der Platte abzulösen.

Daraufhin wurde ein farbstoffbildendes Substrat hinzugegeben, das durch das Enzym der Meerrettichperoxidase zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird, dessen Nachweis durch Fluoreszenz, Farbumschlag oder Chemolumineszenz erfolgte. Im vorliegenden Fall bestand das Substrat aus Hydrogen-Carbonat, dessen Anwendung zu einer Gelbfärbung der Flüssigkeit führte. Zur Quantifizierung wurde eine Serie von Antigenkonzentrationen angelegt, die als Eichkurve für das erzeugte Signal instrumentalisiert wurde. An den festgelegten Untersuchungstagen 7, 14 und 21 wurden die normierten Überstände von 300 µl aus den einzelnen Konstrukten abpipettiert und zur Aufbewahrung nach Beschriftung bei -20 Grad Celsius im Gefrierschrank zwischengelagert. Als Positivkontrolle dienten dem Amylase-ELISA-Set hinzugefügte Standardlösungen mit definierten Konzentrationen.

Die Durchführung des ELISA-Tests erfolgte nach dem Protokoll des Hölzel-ELISA-Sets für Amylase. Insgesamt wurden die Proben von 20 Patienten untersucht. Untersuchungstage waren auch hier wieder die Tage 7, 14 und 21 nach der Besiedelung der PUR-Matrix. Jede Probe wurde als Dublette auf der beschichteten 96-Mikrotiterplatte (Hölzel Diagnostika; Köln, D) angelegt. Mit dem ELISA-Reader (Multiskan EX; Thermo Fisher Scientific; Schwerte, D) und einer Wellenlänge von 450 nm konnte der Gehalt an  $\alpha$ -Amylase der unterschiedlichen Proben zahlenmäßig erfasst werden.

### **2.6.1 Bestimmung der *in vitro* gezüchteten Parotiszellen mittels indirekter Immunfluoreszenz**

Zur genaueren histologischen Begutachtung wurde neben der „klassischen“ Färbung eine Methodik aus der Immunhistochemie, die Immunfluoreszenz herangezogen. Mit dieser Technik lassen sich spezifische Strukturen, abgestimmt auf die jeweilige zu untersuchende Zellpopulation, durch Antikörpermarkierung darstellen. Diese verwendeten Antikörper können mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden. Dabei kam die so genannte indirekte Immunfluoreszenz zum Einsatz, bei der die Zielstruktur, ein Antigen mit einem ungebundenen Erstantikörper, markiert wird. In einem nächsten Schritt wurden fluorochrommarkierte Zweitantikörper hinzugeben, die sich spezifisch gegen die Erstantikörper richten.

### **2.6.2 Darstellung der Zellmorphologie mit Pan-Cytokeratin**

Cytokeratine, Bestandteile des Zytoskeletts, verteilen sich im menschlichen Organismus nach einem bestimmten Muster. So findet sich beispielsweise Cytokeratin 7 (CK7) in verschiedenen Gangepithelien wie der Brust-, Schweiß- oder Speicheldrüse wieder

## 2 Material und Methoden

---

(Moll *et al.*, 1982). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse lässt sich mit monoklonalen Cytokeratin-spezifischen Antikörpern der Ursprung der angefärbten Zielstrukturen genau lokalisieren.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Antikörper gegen humanes Pan-Cytokeratin der Untergruppe AE1/AE3 eingesetzt. AE1 bestimmt saure Subkategorien, AE3 basische Subkategorien der Cytokeratine. Der histologische Einsatz dieser Kombination ist ohne Festlegung auf die genaue Zusammensetzung der Filamente zur Darstellung von normalem und neoplastischem Epithel möglich. Um die Strukturen der Pan-Cytokeratin und  $\alpha$ -Amylase darstellen zu können, wird allgemein die Immunfluoreszenz-Technik genutzt. Grundsätzlich handelt es sich dabei um ein histochemisches Verfahren, bei dem Antigene durch Immunfluoreszenz, d. h. durch fluorochromierte Antikörper nachgewiesen werden können. Zu diesem Zweck wurden die vorgesehenen Konstrukte zu den jeweiligen Untersuchungstagen 7 und 14 in einer 24 Well-Platte durch Hinzufügen von 4%igem PFA geblockt. Die Flüssigkeit wurde über 15 min auf den Proben belassen, um der Austrocknung entgegenzuwirken. Die Reinigung der Konstrukte erfolgte durch mehrmaliges Eintauchen in PBS. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 0,1 % Triton X und 10 % FCS in PBS geblockt. Dadurch konnten unspezifische Fluoreszenzsignale vermieden werden. Zur Sicherstellung einer kompletten Versiegelung wurde die Flüssigkeit über einen Zeitraum von 20 min auf den Proben belassen. Es folgte nun der erste Inkubationsschritt, bei dem die Antikörper gegen die Zielstrukturen auf die Konstrukte aufgetragen wurden. Die folgende Tabelle zeigt die Zielstrukturen der Immunfluoreszenz.

**Tabelle 1: Zielstrukturen der Immunfluoreszenz**

<b>Antikörper gegen</b>	<b>AK-Spezies</b>	<b>Zielstruktur</b>
Pan-Cytokeratin	Kaninchen - monoklonal, anti-human	Epithelzelle in Drüsengängen
$\alpha$ -Amylase	Kaninchen - monoklonal, anti-human	Isoenzym im Speichel

Im Anschluss daran wurden die Proben mehrmals mit PBS gewaschen. Danach wurden die Verbindungen mit Fluorescein-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (siehe Tabelle 3) visualisiert und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die einzelnen Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Fluoromount-GTM, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) dargestellt, welcher vorher im Verhältnis

1:500 mit PBS verdünnt wurde. Der Farbstoff befand sich dabei an der DNS, sodass an dieser Stelle eine blaue Fluoreszenz sichtbar wurde. Die übrigen Konstrukte wurden derweil bei 4 Grad Celsius in einer verdunkelten Box aufbewahrt.

Humanes Parotisdgewebe auf Basis von Gefrierschnitten wurde zur Positivkontrolle genutzt. Zum Zwecke der Negativkontrolle wurden aus den OP-Proben Bestandteile des umgebenden Bindegewebes am Drüsengewebe mit einem Einmal-Skalpell (FEATHER Safety Razor CO., LTD.) entfernt. Die daraus gewonnenen Fibroblasten wurden in separaten 24-Well-Platten herangezüchtet. Dieser Schritt erfolgte nach der Protokollierung für die Versorgung der humanen Parotiszellen. Die mikroskopischen Untersuchungen sowie das Erstellen der Bilder erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop DMI 4000B der Firma Leica. Tabelle 2 gibt AK-Spezies und Isotyp/Färbung der Fluorescein-markierte Zweitantikörper wieder.

**Tabelle 2: Fluorescein-markierte Zweitantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>AK-Spezies</b>	<b>Isotyp/Färbung</b>
Alexa Fluor 488	Ziege - monoklonal, Anti-Kaninchen	IgG/ grün
Alexa Fluor 555	Ziege - monoklonal, Anti-Kaninchen	IgG/ rot

### 2.6.3 Mikroskopische Bildaufnahmen der Immunfluoreszenz

Um die Proben visualisieren zu können, wurde ein Sagnac-Interferometer Spectra Cube SD-200 (Applied Spectral Imaging (ASI), MigdalHaemek, IL) eingesetzt. Das System beinhaltet eine Xenon Kurzbogenlampe, Stärke 75 Watt, mit einem durchgehenden Lichtspektrum von ca. 270 – 700 nm benötigt. Die Untersuchung erfolgte mit drei verschiedenen Filtersets, dem Anregungsfilter, einem Strahlfilter und einem Emissionsfilter. Die Aufnahmen der Einfach- und Mehrfachfärbung wurden mit dem Tripleband Filterset realisiert. Auf diese Art konnten gleichzeitig die unterschiedlichen Spektren blau, grün und rot untersucht werden. Auch war es dadurch möglich, der DAPI-Färbung die gesuchten Fluorochrome gegenüberzustellen. Um das komplette Farbspektrum erfassen zu können, wurden zwei unterschiedliche Spektral-Interferometer zur Bilddarstellung und -auswertung der Färbungen eingesetzt. Dies hatte zur Folge, dass der gleiche Bildausschnitt doppelt aufgenommen werden musste. Gemäß Angaben des Herstellers emittieren die Geräte Fluorochrome in einem Bereich von 444 nm bis 639 nm. Dies deckte den zu untersuchenden Bereich von blau bis infrarot ab. Die

Präparate wurden mit einer maximalen Vergrößerung von 250  $\mu\text{m}$  in einem geschlossenen abgedunkelten Raum durchgeführt, um äußere Lichteinflüsse, die das Ergebnis verzerren könnten, zu minimieren. Der Spectra Cube ist hier direkt an das 4000 DMI B Mikroskop angeschlossen und mit einer 1,3 Megapixel schwarz-weiss CCD Kamera verknüpft. Das komplette System wiederum war an einem PC mit dem Betriebssystem Windows 7 Enterprise, 32-bit Operationssystem, Service Pack 1, Hauptprozessor Intel® Core™ Duo CPU E8400 mit 3,00 GHz und 4,00 GB installierten Speicher (RAM) verbunden. Die installierte Software LAS V3.7 (Leica) stand für die optische Darstellung und Bildfusionierung zur Verfügung. Die verwendete Technik beruht auf dem sogenannten Linear unmixing, welche eine Auflösung unter 30 nm Wellenlänge ermöglichte. Ein Wert, den das menschliche Auge nicht mehr wahrnehmen kann (Malik *et al.*, 1996; Rothmann *et al.*, 1998).

### **2.6.4 Bildanalyse mit Hilfe des Raster- und Transmissionselektronenmikroskops**

Histologische Schnitte stoßen in Ihrer Darstellungsmöglichkeit an die Grenze der Auflösung der Lichtmikroskopie. Um Antworten bezüglich der Struktur des Polyurethans sowie der geschlossenen und offenen Poren der Matrix zu bekommen, war die Verwendung eines Raster- und eines Elektronenmikroskops notwendig. Das Prinzip des Geräts geht auf eine Erfindung des Physikers Hans BUSCH zurück, der im Jahre 1925 entdeckte, dass man ein Magnetfeld als Elektronenlinse benutzen kann. Er baute als erster ein optisches Elektronenmikroskop, bei dem ein Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster über das vergrößert abzubildende Objekt geführt gerastert wird, und Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt zur Erzeugung eines Bildes des Objekts induziert. Die mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) erzeugten Bilder sind also Abbildungen der Objektoberflächen und weisen eine sehr hohe Tiefenschärfe auf (von Ardenne, 1938).

Das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Rasterelektronenmikroskop vom Typ DSM 950 der Firma Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D) wurde nach Protokoll und unter Anleitung durch Mitarbeiter der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften Universität Würzburg Prof. Dr. G. Krohne eingesetzt. Ein Rasterelektronenmikroskop verknüpft das allgemeine Elektronenmikroskop mit einem zusätzlichen Rasterprozess.

## 2 **Material und Methoden**

---

Grundsätzlich basiert das Rasterelektronenmikroskop auf der Abrasterung der Objekt-oberfläche mittels eines feingebündelten Elektronenstrahls. Mit Hilfe von Magnetspu- len wird der Elektronenstrahl auf einen Punkt auf dem Objekt fokussiert. Trifft der Elekt- ronenstrahl auf das Objekt, sind verschiedene Wechselwirkungen möglich, deren De- tektion Informationen über die Beschaffenheit des Objekts geben. Die Intensität des Signals kann dann digital ausgewertet werden. Der gesamte Vorgang setzt eigentlich ein Hochvakuum voraus, um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden. Dennoch war und ist die Erzeugung ein absolutes Vakuum auf der Erde kaum möglich, deshalb begnügt man sich bei der Technik mit einem den Anforderun- gen entsprechendem Vakuum.

Der von der Kathode ausgehende Primärelektronenstrahl wird – ähnlich dem Prinzip eines Röhrenfernsehers – zeilenweise über die Oberfläche des Objekts geführt (Ras- tern), während das Signal in digitale Grauwertinformationen umgewandelt und syn- chron auf dem Bildschirm dargestellt wird. Sind alle Zeilen abgetastet, fängt das Ras- tern erneut am oberen Bildrand an. Das so erzeugte Bild ist nun nicht mehr die Ver- größerung eines Gesamtbildes, vielmehr handelt es sich um die graphische Darstel- lung des Verhältnisses zwischen der abgerasterten Probenfläche und der Monitor- gröÙe. Die Vergrößerung kann bei den meisten Geräten nahezu stufenlos eingestellt werden.

Neben den bereits angesprochenen Problemen von eventuellen Wechselwirkungen von noch vorhandenen Mikrostrukturen im Vakuum ist außerdem zu beachten, dass die Topografie der Probe, Flächenneigung, Abschattung, Aufladung usw., den Kon- trast ebenfalls beeinflussen und damit auch Materialinhomogenitäten vortäuschen kann. Das Volumen, in dem es zu derartigen Interaktionen kommt, hängt neben dem Material der untersuchten Probe (Ordnungszahl) stark von der Beschleunigungsspan- nung ab. Bei 20 kV liegt die Auflösung bei etwa 1  $\mu\text{m}$  – daraus resultiert eine schlech- tere Auflösung. Das hier verwendete Rasterelektronenmikroskop verfügt über eine technische Lösung (Elektronenoptik, Detektor) dafür, dass der Rückstreukontrast bei sehr kleinen Beschleunigungsenergien (1 keV und darunter) zur Abbildung benutzt wird. Wegen des kleinen Anregungsvolumens bei diesen Energien erhält man auch eine deutlich bessere Ortsauflösung (Lofink *et al.*, 2012).

Zum Erhalt der Feinstrukturen und zur Stabilisierung der Proben waren die Präparate über Nacht in 6,25-prozentigem Glutaraldehyd bei + 4°C fixiert worden. Am darauffol- genden Tag wurden die Proben fünfmal mit 100 mM Sörensenpuffer gereinigt. Die

## 2 Material und Methoden

---

Zusammensetzung des verwendeten Sørensen Phosphat-Puffers beinhaltete Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ), Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) und destilliertes Wasser. Die Flüssigkeit wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. In der Folge schloss sich die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe von 30 Prozent bis 100 Prozent an. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert. Dabei blieb ein Flüssigkeitsrest im Glasgefäß zurück, der gewährleistetet sollte, dass die Probe nicht austrocknet. Es folgte die Überführung der Proben abhängig von der Größe in ein grobmaschiges Drahtsieb (Specimen baskets, Leica Microsystems, früher: BAL-TEC AG, Liechtenstein) und die Lagerung in 100 % Aceton. Die Kritisch-Punkt-Trocknung (engl. *critical point drying*, CPD) wurde mit dem *Critical Point Dryer* CPD 030 (BAL-TEC AG, Balzers, FL) fertig gestellt. Als nächster Schritt wurde das Drahtsieb samt Probe, umspült von 100-prozentigem Aceton, in die Probenkammer des CPD 030 gelegt. Zur Weiterverarbeitung im CPD 030 mussten die Proben auf + 5 Grad Celsius abgekühlt werden. Im Anschluss war die gesamte abgepumpte 100-prozentige Acetonlösung durch einströmendes flüssiges  $\text{CO}_2$  zu ersetzen. Dies musste sehr vorsichtig in insgesamt acht Schritten vollzogen werden, woraufhin eine schrittweise Erhöhung der Temperatur auf + 31 Grad Celsius bei einem Atmosphärendruck von 74 bar mit der Kritisch-Punkt-Trocknung begonnen werden konnte. Danach wurde die Beheizung abgebrochen, woraufhin das  $\text{CO}_2$ -Gas über einen Zeitraum von ca. zwei Stunden über ein Ablassventil entweichen konnte.

Um die Proben auf dem Rasterelektronenmikroskop zu fixieren, wurden die Objekteller mit doppelseitiger Klebefolie versehen. Nun konnten die Objekteller mit den Proben beschichtet werden. Die Beschichtung erfolgte mit einem Sputter Coater SCD 005 (BAL-TEC AG), der eine Mischung aus Gold/Palladium im Verhältnis 80:20 auf den Objekteller auftrug. Danach erfolgte die Flutung der Kammer des SCD 005 mit Argongas. Die so erzeugten Ionen wurden in einem elektrischen Feld ( $V = 2,5\text{kV}$   $I = 20\text{mA}$ ) auf das Target aus Gold/Palladium beschleunigt. Sie stießen dabei Atome heraus, was zu einer Ablagerung einer dünnen Gold/Palladium Schicht auf der Probe führte. Die so getrockneten und besputterten Proben konnten in einem Exsikkator (NOVUS NS-Tubus, DURAN Group GmbH, Mainz, D) über mehrere Monate aufbewahrt werden.

Wie das Rasterelektronenmikroskop so ist auch das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) eine Variante der Elektronenmikroskopie. Der große Unterschied der beiden Arten besteht im notwendigen Schneiddickegrad der Proben. Bei dem Raster-

elektronenmikroskop wird die Probe so bedampft, dass die Elektronen die Oberflächenstruktur abtasten (abrastern). Die Schnittdicke der Probe ist hier nicht entscheidend. Bei der Arbeit mit dem TEM durchwandern die Elektronen das Objekt zur Bildzeugung. Aus diesem Grund dürfen die Proben eine bestimmte Schichtdicke nicht überschreiten. Die einzelnen Proben bewegen sich im Rahmen von 10 nm bis zu einigen 100 nm. Nach momentanem Stand der Technik lassen sich zwei Objekte mit einem minimalen Abstand von 0,5 nm getrennt voneinander darstellen. Im vorliegenden Projekt wurden 60-70 nm dünne Schnitte untersucht.

Die Behandlung, die Betrachtung und Fotodokumentation der Proben fand durch die Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften AG Prof. Dr. G. Krohne an dem Transmissionselektronenmikroskop JEM 2100 (Jeol GmbH, Freising, D) in Würzburg statt.

### **2.6.5 Einsatz der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion**

Durch den Einsatz der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion kann DNS außerhalb eines lebenden Organismus vervielfacht werden. Im Prinzip handelt es sich um eine modifizierte Variante der PCR. Der Vorteil der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion liegt in der Möglichkeit, bestimmte DNS-Abschnitte quantitativ bestimmen zu können. Dafür stehen grundsätzlich mehrere Methoden zur Verfügung. Im vorliegenden Fall wurde der Nachweis mit der Methodik des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) und die Bestimmung des Genotyps mit der TaqMan-Analyse (siehe Abbildung 12) erbracht. Diese besteht aus einem Oligonukleotid, das am 5-Grad-Ende einen Donor (=Reporter) und am 3-Grad-Ende einen Acceptor – Anteil (=Quencher) enthält.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, wird durch die Synthese des Gegenstranges die Taq-Polymerase am Fünf-Grad-Ende der Sonde ein so genanntes Reporter-Teil abgespalten. Da sich dadurch der Abstand zwischen den funktionellen Enden vergrößert, kommt es zu einer Vergrößerung der Fluoreszenzenergie am Donorteil, die gemessen werden kann. Dadurch können die Sonden zur Quantifizierung der DNS-Abschnitte herangezogen werden (Edwards *et al.*, 2004). Die hier aufgezeichneten Werte wurden nun durch den sogenannten  $C_t$ -Wert (engl. *cycle threshold*) quantitativ erfasst.

Die theoretische Variable beschreibt dabei jenen Punkt der Kurve, an dem das gemessene Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über den Hintergrundwert steigt. Durch die spezielle Art der Amplifizierung der Genabschnitte stellt der  $C_t$ -Wert den Ausgangs-

## 2 Material und Methoden

punkt einer exponentiellen Kurve dar. Je niedriger dieser Threshold Cycle Wert ausfällt, desto höher war die Konzentration an messbarer Desoxynucleinsäure (Kück *et al.*, 2005). Im Umkehrschluss heißt das, dass bei einem sehr hohen Ct-Wert, eine sehr niedrige DNS-Konzentration in der Ausgangssituation vorgelegen haben muss.

Um den hier beschriebenen finalen Schritt der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion durchzuführen, waren noch einige vorbereitende Maßnahmen notwendig. Erst einmal mussten die gewonnenen Konstrukte so behandelt werden, dass es beim Aufbewahren der Proben zu keinem Verlust an Zellen, bzw. DNS kommt. Der nächste Schritt bestand in der Lyse der Zellen, um die darin liegende RNS extrahieren zu können. Mit Hilfe eines Enzyms, der Transverse Transkriptase, wurde danach auch die dazu komplementäre DNS (kDNS) gewonnen. Nun folgte der letzte, schon oben beschriebene Schritt, bei dem durch die TaqMan-Sonden und der kDNS die zu vervielfältigende DNS hergestellt wurde.

Nun konnte zur RNS-Isolierung von *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen übergegangen werden. Zu diesem Zweck wurden die Konstrukte in einprozentiger PBS gewaschen und dann mit 0,5 ml RNAlater (Ambion, Austin, USA) bei -20°C in einem Eppendorfer Cup der Größe 5 ml aufbewahrt. Dies führte zu einer sofortigen Inaktivierung der RNS-Aktivität, ohne die eine längere Lagerung der Proben nicht möglich gewesen wäre. Der vorhandene Überstand wurde abpipettiert und das Eppendorfer-Reaktionsgefäß in einer Minizentrifuge mit

13.000 rpm für 10 min geschleudert. Das besiedelte Konstrukt befand sich dadurch am Boden des Gefäßes. Als nächstes wurde das Reaktionsgefäß mit PBS wiederaufgefüllt. Erneut wurde die Suspension zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abpipettiert. Durch Zugabe von 600 µl RLT-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, D) erfolgte

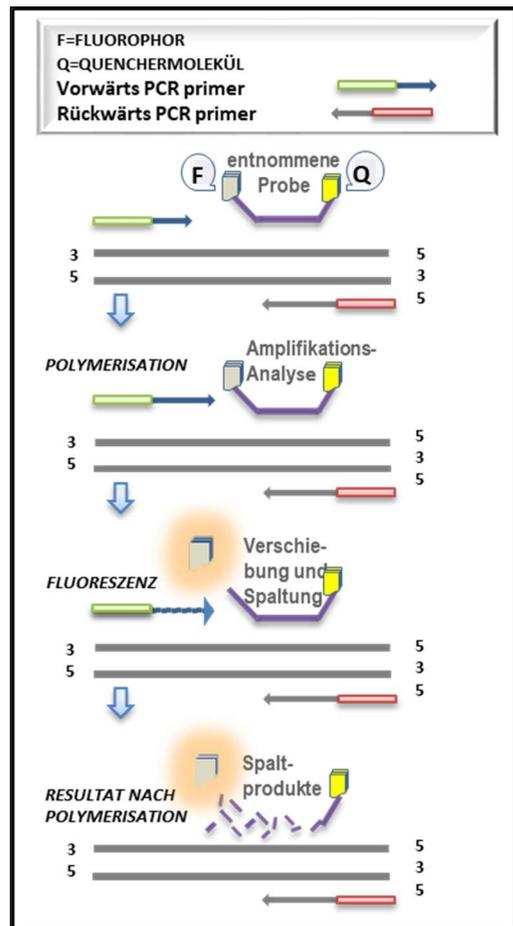


Abbildung 12: Mechanismus der Taq-Man PCR

Das Ende des einen Arms wird mit Fluorophor markiert, das Ende des anderen Arms mit einem Quencher - Molekül. Durch unterschiedliche Entfernung des Fluorophors und des Quenchers kann die Fluoreszenz nachgewiesen werden.

## 2 *Material und Methoden*

---

die Zell-Lyse. Bei 37 Grad Celsius wurde das Lysat für 30 min auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Der Überstand wurde nun in neue beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt. Damit lagen die Zellen in gelöstem Zustand vor und waren bereit für die Weiterverarbeitung.

Im darauffolgenden Arbeitsschritt wurden 600 µl an Ethanol zum Lysat hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Hälfte des Lysats, insgesamt 600 µl Flüssigkeit, wurde in eine beschriftete RNeasy Spin-Säule gegeben und für 15 sec mit 13.000 rpm unter Raumtemperatur zentrifugiert. Die Bestandteile des Durchflusses, die sich daraufhin im Sammelröhrchen befanden, wurden danach verworfen. Mit den restlichen 600 µl wurde in gleicher Weise verfahren. Für die gesamte Flüssigkeit von 1,2 ml wurde dieselbe RNeasy Spin-Säule verwendet, in der sich nun die RNS an eine Membran gebunden befand. Durch Zugabe von zunächst 700 µl RW1 Puffer und anschließender Zentrifugation mit 13.000 rpm für 15 sec wurde die RNeasy Spin-Säule gewaschen. Im Anschluss folgten zwei weitere Waschschriffe, in deren Anschluss die Lösung wiederum zentrifugiert wurde: Zuerst für 15 Sekunden und dann für 2 Minuten – bei einer Umdrehungszahl von 13.000 rpm. Durch Pipettieren von 30 µl RNase-freiem Wasser konnte die RNS aus der Membran eluiert werden; anschließend wurde sie für eine Minute mit 13.000 rpm zentrifugiert und auf Eis gestellt. Unter Hinzufügung von 1 µl RNase Inhibitor wurde die RNS bei -20°C aufbewahrt.

Das Experiment wurde mit dem Arbeitsschritt kDNS-Synthese aus isolierter RNS fortgesetzt. Zur Synthese der komplementären DNS wurde die Reverse Transkriptase des „High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix“ (Master Mix) der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, D) eingesetzt. Insgesamt 4 µl RNS, 4 µl des Master Mix wurden zusammen mit 12 µl Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) in einem ersten Schritt für 5 Minuten mit 25 Grad Celsius und im zweiten Schritt über 30 Minuten mit 42 Grad Celsius inkubiert. Das Erhitzen auf 95 Grad Celsius für fünf Minuten sowie die Hinzufügung von DEPC diente abschließend zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Um für jede Probe die gleiche Basis herstellen zu können, mussten für die jeweiligen Versuchsserien eine möglichst schwankungsarme und gleichbleibende Konzentration von kDNS gewährleistet werden. Dazu diente eine biophotometrische Messung. Hierbei wurde von der jeweiligen kDNS eine Verdünnung von 1:50 hergestellt. Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen des Eppendorf Biophotometers wurde als Endkonzentration 100 ng/µl festgelegt. Durch Verdünnen mit RNS-freiem

## 2 Material und Methoden

Wasser wurden standardisierte DNS-Konzentrationen der Proben erzeugt. Die Ansätze wurden verdünnt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 2.6.6 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion zur Funktionstestung der Primer $\alpha$ -Amylase, Cytokeratin 7 und Aquaporin 5

Die Durchführung der PCR erfolgte mit TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Die dazugehörenden genspezifischen Primer waren  $\alpha$ -Amylase, Cytokeratin 7 und Aquaporin. Um die Folgen, beispielsweise eine Fehl-Pipettierung, zu minimieren, wurden vorab Ansätze für die TaqMan-Assays hergestellt. Dabei wurden die Proben als Duplices in 50  $\mu$ l Hülsen zur Berechnung des Mittelwertes angesetzt. Um kongruente Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden auch die Volumina für die gesamten Proben fixiert. Die folgende Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung der einzelnen Komponenten sowie ihrer Konzentrationen.

**Tabelle 3: Zusammensetzung TaqMan-Assay**

Komponenten	Reaktion Volumen ( $\mu$ l)
TaqMan Gene Expression Master Mix	10
TaqMan Gene Expression Assay	1
kDNS	1
DEPC-H <sub>2</sub> O	8

Die folgende Tabelle 4 zeigt die Inkubation der Proben im Analysegerät RT-PCR StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D).

**Tabelle 4: Inkubation der Proben im Analysegerät für die RT-PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	25°C	10 min	UDG Intubation
2	95°C	10 min	Enzymaktivierung der DNS-Polymerase Ampli Taq Gold
3	95°C	15 sec	Denaturierung der doppelsträngigen DNS
4	60°C	30 sec	Annealing-Temperatur
5	72°C	30 min	Elongation
6	60°C	1 min	Abkühlung
7	95°C	10 min	Wiederholung des Zyklus

### 2.6.7 Analyse der relativen Genexpression

Die sogenannten  $C_t$ -Werte wurden als Messgröße für die Vervielfältigung der DNS-Startmenge verwendet. Die  $C_t$ -Werte wurden neben den Zielsequenzen  $\alpha$ -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 7 auch vom Haushaltsgen GAPDH und EF1 $\alpha$  als Referenzen mitgemessen. Als Positivkontrolle diente hier kDNS aus extrahiertem humanem nativem Parotisdgewebe zweier Patienten. Wie die Proben durchlief es die entsprechenden Behandlungszyklen. Grundsätzlich gilt für das Analysieren der PCR-Werte, dass bei einem hohen  $C_t$ -Wert nur geringe Mengen des zu untersuchenden DNS-Abschnitts zur Replikation vorliegen. Je niedriger die Wiederholungszahl der PCR ausfällt, umso größer ist die Anzahl der gesuchten DNS-Abschnitte in der Probe. Als Negativprobe wurde DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Für eine Vergleichbarkeit des DNS-Gehalts wurde die Differenz aus der Menge an Ziel-DNS ( $C_t$  (Zielgen)) und der Menge des Referenzgens ( $C_t$  (Referenzgen)) berechnet.

**Formel 2:**

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen})$$

Um eine robuste Reliabilität zu gewährleisten, wurden zwei nichtregulierte Referenzgene hinzugezogen. Bei einer geringen Anzahl zur Verfügung stehende Proben wurden lediglich zur internen Kontrolle die etablierten Referenzgene GAPDH und EF1 $\alpha$  verwendet (Huggett *et al.*, 2005; Vandesompele *et al.*, 2002).

Die Berechnung erfolgte analog zu den beiden folgenden Formeln, wobei die angegebene Reihenfolge verwendet wurde:

**Formel 3:**

$$\frac{\Delta C_t(C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{GAPDH}))}{\Delta C_t(C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{EF1}\alpha))} = \text{Ergebnis1}$$

**Formel 4:**

$$2^{-\text{Ergebnis1}} = \text{Ergebnis2}$$

Zur Ermittlung der Genexpression einer Probe, bezogen auf den Untersuchungstag 7, wurde Formel 4 mit dem Ergebnis 2 verwendet: Das sich errechnende Ergebnis 2 von

Untersuchungstag (UT) 7 wurde gleich 1 gesetzt. Relative Genexpressionswerte (RGE)  $<1$  bedeuten somit eine geringere Expressionsrate und Werte  $>1$  eine erhöhte Expressionsrate der Zielgene. Ab einem Ct-Wert von 38 kann die Genexpression als negativ angesehen werden.

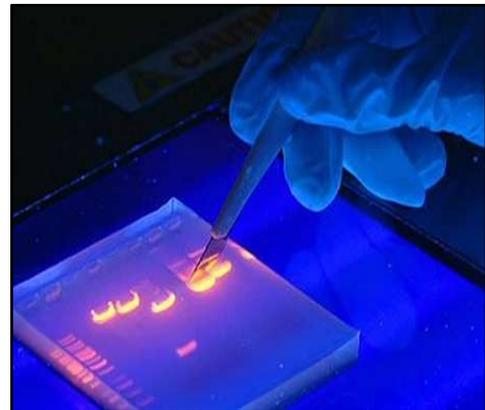
### 2.6.8 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNS-Molekülen, um daraus ihre Größe im Vergleich zum Standardwert bestimmen zu können. Dabei wurden die Nucleinsäuren unter der Wirkung eines elektrischen Feldes durch die Gelmatrix gezogen. Aufgrund ihrer negativen Ladung wurden sie separiert, da die kleineren Moleküle einen größeren Weg zur positiv geladenen Elektrode zurücklegen mussten. Nach dem Abschalten des elektrischen Feldes wurden die untersuchten DNS-Abschnitte durch das eingelagerte Ethidiumbromid unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht (Abbildung 13).

Die Agarose-Konzentration des Gels lag bei 2 %, 3,0 g des Agarosepulvers LE (Biozym Scientific, Oldendorf, D) versetzt mit 150 ml TRIS-Acetat-Puffer (TAE, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D). Der Elektrophoresepuffer dient zusätzlich zur Trennung der DNS. In dem Mikrowellengerät Privileg 8020 (Quelle, Fürth, D)

wurde das Gemisch 3 min bei 600 W aufgekocht und mit 0,03  $\mu\text{l/ml}$  Ethidiumbromid versetzt.

Das flüssige, erhitzte Gel wurde nun in einen Gelschlitten (PeqLab Biotechnology, Erlangen, D) gegossen und 30 Minuten abgekühlt. Nach Erhärtung wurden die Proben mit Ladepuffer in die vorgesehenen Taschen auf der Seite der negativen Elektrode positioniert. Die Auftrennung der einzelnen DNS-Fragmente dauerte eine Stunde mit einer angelegten Spannung von 80 V und 180 mA in der Gelelektrophoresekammer (PeqLab Biotechnology). Nach dem Abschalten des Stroms wurde das Gel aus der Kammer entnommen und auf den Transilluminator positioniert. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Blasen bildeten. Unter Bestrahlung mit UV-Licht von 312 nm konnten die Fragmente sichtbar gemacht, fotografisch dokumentiert und optisch ausgewertet werden.



**Abbildung 13: Beispiel einer Gelelektrophorese**

Die Banden sind hier unter Blaulicht hervorgehoben (DFG-Forschungszentrum Würzburg)

### 2.7 Vorgehen bei der statistischen Auswertung

Für statistische Auswertungen steht im deutschen Hochschulbereich das Programm SPSS Statistics (International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, New York, USA) zur Verfügung. Hier kam die Version 20 zum Einsatz.

Die statistische Untersuchung betraf vor allem die erhobenen Werte des ELISA sowie die Ergebnisse der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion. Es galt hier, statistisch signifikante Unterschiede zu untersuchen. Das Signifikanzniveau wurde dabei mit  $p \leq 0,05$  festgelegt. Als statistische Testverfahren dienten der Wilcoxon- und der Friedmanstest.

Der Wilcoxontest ist ein nicht-parametrisches Verfahren zum Vergleich von zwei gepaarten Stichproben. Mit seiner Hilfe lässt sich untersuchen, ob sich die gemessenen Konzentrationen unterscheiden. Die hier zugrundeliegende Nullhypothese ( $H_0$ ) besteht in der Annahme, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Variablen, hier die jeweiligen Konzentrationen, besteht; die Alternativhypothese  $H_1$  beschreibt hingegen ein Szenario, das von einem signifikanten Unterschied zwischen den getesteten Variablen ausgeht.

Ebenfalls ein nicht-parametrischer Test ist der Friedmanstest. Dieser wird herangezogen, wenn drei- oder mehr gepaarte Stichproben verglichen werden sollen. Dazu werden den Mittelwerten der verschiedenen getesteten Konzentrationen jedes einzelnen Patienten nach ihrer Größe Ränge zugewiesen. Anschließend werden die Ränge der einzelnen Patienten aufsummiert. Es ist dann möglich, die Rangsummen der unterschiedlichen Konzentrationen miteinander zu vergleichen.

Zur grafischen Darstellung wurden sogenannte Boxplots gewählt, welche mit dem Datenanalyseprogramm SPSS erstellt werden konnte. Die Lageparameter bilden hier die waagrechte Linie, die in der Box den Median abbildet, der sich aus  $n$ -Mittelwerten zusammensetzt. Die untere Beschränkung der Box stellt die Abweichung durch die 25. Perzentile dar, die obere Begrenzung der Box entspricht der Abweichung der 75. Perzentile. Werte, die zwischen 1,5 und 3 Seitenlängen außerhalb der Box liegen, werden als Ausreißer bezeichnet und sind durch einen Kreis markiert. Werte, die mehr als 3 Seitenlängen außerhalb der Box liegen, werden als Extremwerte definiert und sind durch einen Stern gekennzeichnet. Der Maximal- und Minimalwert im Bereich von 1,5 Seitenlängen wird jeweils durch eine T-förmige Linie ober- und unterhalb der Box markiert.

## **2 Material und Methoden**

---

Die gewonnenen Werte der Genexpression von  $\alpha$ -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 7 aus der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion werden im Folgenden durch Balkendiagramme visualisiert. Zur Erzeugung der Diagramme wurde das Excel 2010 Programm von Microsoft (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) genutzt. Die x-Achse zeigte dabei die Genexpression relativ zu Patient 1, die y-Achse die Untersuchungstage 7, 14 und 21 der Patienten 1-3 an.

## 3 DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

In diesem Abschnitt wird zunächst die Patientenkohorte vorgestellt, im weiteren Verlauf die Vitalitätsbestimmung. Anschließend erfolgt die Darstellung des Nachweises von  $\alpha$ -Amylase im Überstand mit Sandwich-ELISA und der Nachweis von  $\alpha$ -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 7 mittels der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion.

Danach folgt die Erläuterung der histologischen Untersuchungen, speziell zunächst auf  $\alpha$ -Amylase und Pan-Cytokeratin durch indirekte Immunfluoreszenz, die Dokumentation und Interpretation der Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der besiedelten Konstrukte zum Untersuchungstag 7 und der Transmissionsmikroskopaufnahmen der besiedelten Konstrukte zum Untersuchungstag 14. Eine Kurzzusammenfassung der Ergebnisse schließt dieses Kapitel ab.

### 3.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die Charakteristika der Studienkohorte sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Dabei ist in der zweiten Spalte das Lebensalter des Patientenkollektivs gerundet in vollen Jahren angegeben. Der Median des Patientenalters betrug danach 52,5 Jahre (Altersbereich von 42 - 90 Jahre). Das männliche Geschlecht überwog mit 55% (11 von 20 Patienten). Das resezierte Gewebe wurde histopathologisch untersucht. Bei einer Person wurde eine maligne Erkrankung, ein B-NHL Lymphom festgestellt. Die restlichen 19 Patienten zeigten in der Aufarbeitung eine tumorfreie, bzw. benigne Erkrankung. Eine Fremdstoffexposition zeigten 41% der 20 Patienten. Nikotinabusus wird bei 82%, also 14 Patienten, dokumentiert. Der Mittelwert des Packungsjahrs (*engl. pack year; py*), die statistisch inhalierte Rauchdosis der pro Tag gerauchten Zigarettenpackungen multipliziert mit der Anzahl der Raucherjahre, beträgt zum Zeitpunkt der Erhebung 25,15 Jahre (Bereich 10 - 45 PY). 82% Patienten (14 von 20 Patienten) gaben an, Alkohol zu konsumieren.

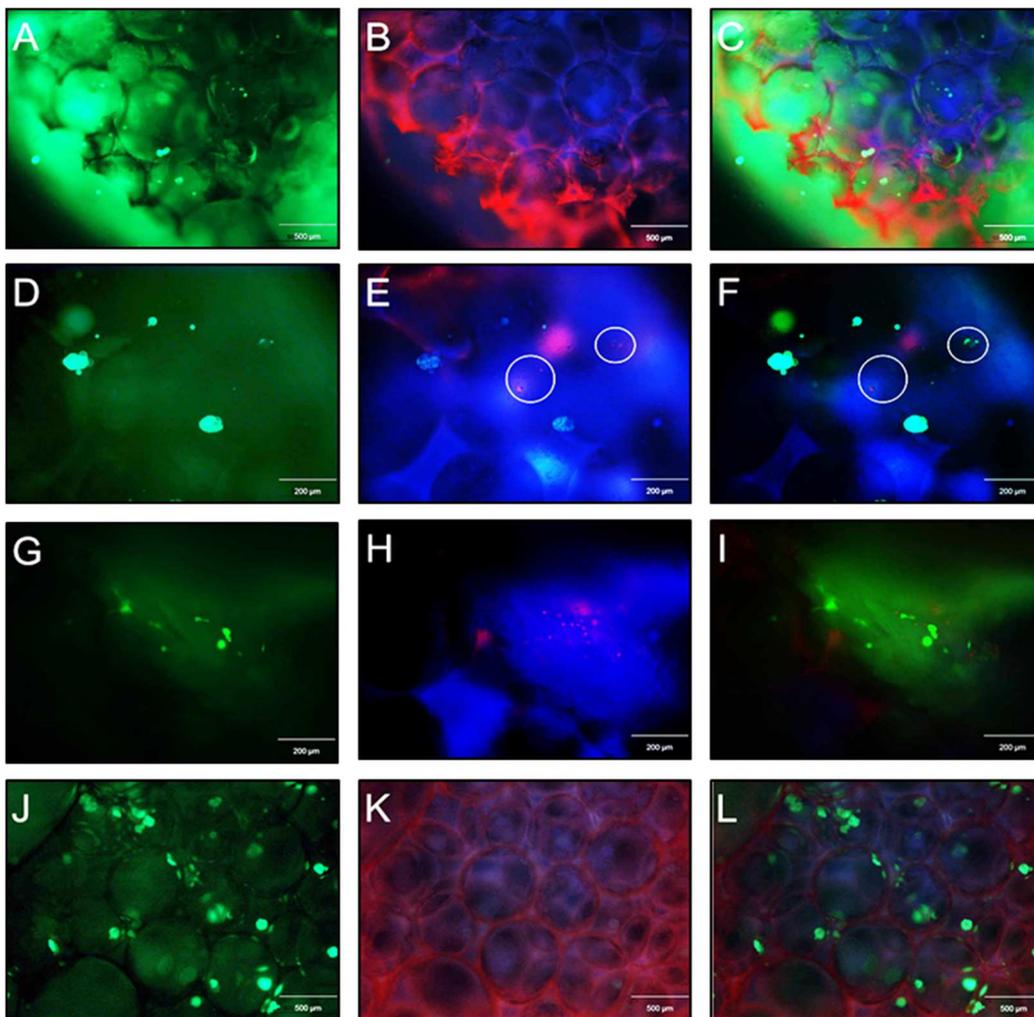
**Tabelle 5: Charakteristika der Studienkohorte:**

**Geschlecht:** weiblich (w) und männlich (m). **Tumorentität:** Ziffer 0 = tumorfrei; Ziffer 1 = Zystadenolymphom; Ziffer 2 = pleomorphes Adenom; Ziffer 3 = Lipom; 11 = B-NHL Lymphom; - = keine histologische Angabe. **Packungsjahr: Angabe in gerauchten Packungsjahren; -9 = keine Angabe. Die restlichen Spalten der Patienteneigenschaften wurden wie folgt verschlüsselt:** Ziffer 0 = Eigenschaft negativ; Ziffer 1 = Eigenschaft positiv; - = keine Angabe im Fragebogen.

Patient/-in	Alter in Jahren	Geschlecht	Tumorentität	Fremdstoffe	Nikotin	Packungsjahr	Alkohol
1	62	w	-	-	0	0	1
2	45	m	-	1	1	20	1
3	81	m	0	1	1	-	1
4	65	w	1	0	1	40	0
5	49	m	1	0	1	12	1
6	46	w	0	0	1	15	1
7	51	w	1	1	1	60	1
8	49	m	0	-	-	-	-
9	81	w	11	0	1	10	1
10	49	m	1	1	1	45	1
11	55	w	0	0	1	25	1
12	40	w	2	0	1	25	1
13	56	m	2	0	1	10	1
14	52	m	1	1	1	20	1
15	90	m	0	0	1	10	1
16	40	m	2	-	-	-	-
17	53	w	2	-	-	-	-
18	62	m	1	1	1	35	1
19	42	m	3	1	0	0	0
20	56	w	1	0	0	0	0

Zur Vitalitätsbestimmung wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz herangezogen. Sie diente der mikroskopischen Beurteilung einzelner Proben. In den folgenden ausgewählten Bildern (Abbildung 14) sind überwiegend einzelne oder gruppierte lebende Parotiszellen zu erkennen. Ohne Softwareunterstützung konnten lediglich Ausschnitte der Konstrukte exemplarisch vorgestellt werden.

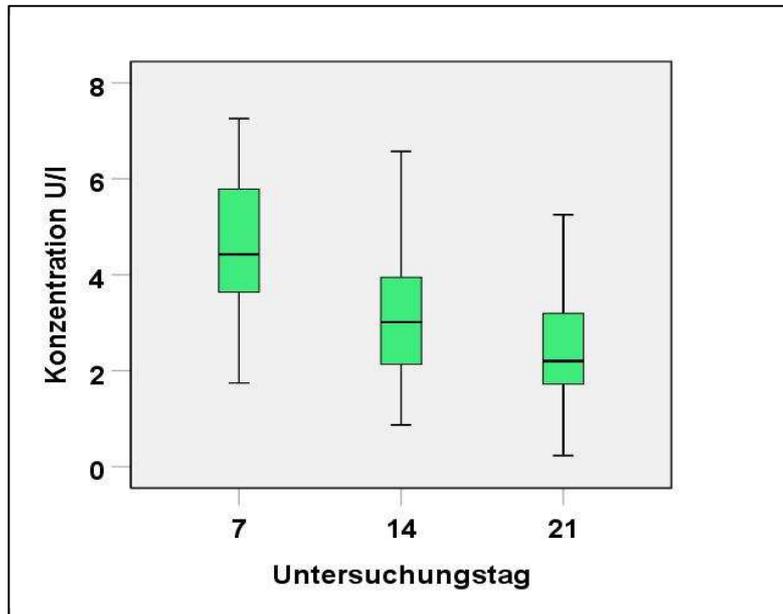
Bei Proben von 20 Patienten wurde an drei Untersuchungstagen das Nährmedium entnommen. Am 7. Untersuchungstag wurde ein niedriger Median von 4,4 U/l an  $\alpha$ -



**Abbildung 14: Lebend/Tot Färbung**

(A-C) UT7; einzelne in Zellhaufen gruppierte Parotiszellen in grüner Fluoreszenz (Lebendfärbung). Im Hintergrund ist die Matrix in rot-blauer Färbung zu sehen, die grüne Hintergrundlumineszenz stellt das Fibrinogen-Thrombin-Gemisch dar. In **Bild D** UT7; sind Acini-ähnliche Strukturen in grüner Färbung zu erkennen. **Bild E** zeigt in roter Färbung einzelne abgestorbene Zellen (im Kreis). **Bild F** der kleinere Kreis markiert sowohl lebende Zellen als auch tote Zellen in einer acini-ähnlichen Struktur. **Bild G** UT14; wenige vitale Zellen sind sichtbar. **Bild H** weist eine lokale Ansammlung von toten Zellen auf. **Bild I** stellt das Fusionsbild dar, in unmittelbarer Nachbarschaft sind vitale sowie avitale Zellen zu erkennen. **Bild J**; UT14 multiple Acini-ähnliche Strukturen sind in grüner Fluoreszenz (Lebendfärbung) über den Schwämmchenabschnitt verteilt. **Bild K** die offenporige Schwämmchenstruktur in rot-blauer Darstellung. **Bild L** die einzelnen lebenden Konglomerate der Parotiszellen sind an den Poren angeheftet.

Amylase durch ELISA festgestellt. Die genaue Konzentration der  $\alpha$ -Amylase konnte durch die chemische Reaktion mit Wasserstoffperoxid photometrisch erfasst und daraufhin anhand der Eichkurve berechnet werden (siehe Abbildung 15). Der  $\alpha$ -Amylase Gehalt am Untersuchungstag 14 wies einen Median von 3,1 U/l auf, was in etwa einem Abfall von 1/4 der gemessenen Werte von Untersuchungstag 7 entspricht. Am Untersuchungstag 21 wurde der niedrigste Median von 2,2 U/l an  $\alpha$ -Amylase-Konzentration gemessen.



**Abbildung 15: Boxplot-Diagramm der gemessenen  $\alpha$ -Amylase-Konzentration mittels ELISA**

Boxplot-Auswertung der ELISA-Messwerte von 20 Patienten über den Zeitverlauf anhand der Untersuchungstage 7, 14, 21. Senkung des Medians der  $\alpha$ -Amylase-Konzentration von 4,4 U/l am UT7 auf 2,2 U/l am UT21.

## 3.2 Histologische Untersuchungen

Zum Nachweis der Proliferation und Anlagerung der Zellen auf der Polyurethan-Matrix wurden diverse histologische Untersuchungsmethoden herangezogen. Zur besseren Darstellung der Zellen auf den besiedelten Matrices wurde Hämatoxylin und Eosin zur Anfärbung benutzt. Wie bereits angedeutet, war es dabei nicht möglich zusammenhängende Schnitte herzustellen, so dass keine Reproduzierbarkeit mehr möglich war.

### 3.2.1 Untersuchung auf $\alpha$ -Amylase und Pan-Cytokeratin durch indirekte Immunfluoreszenz

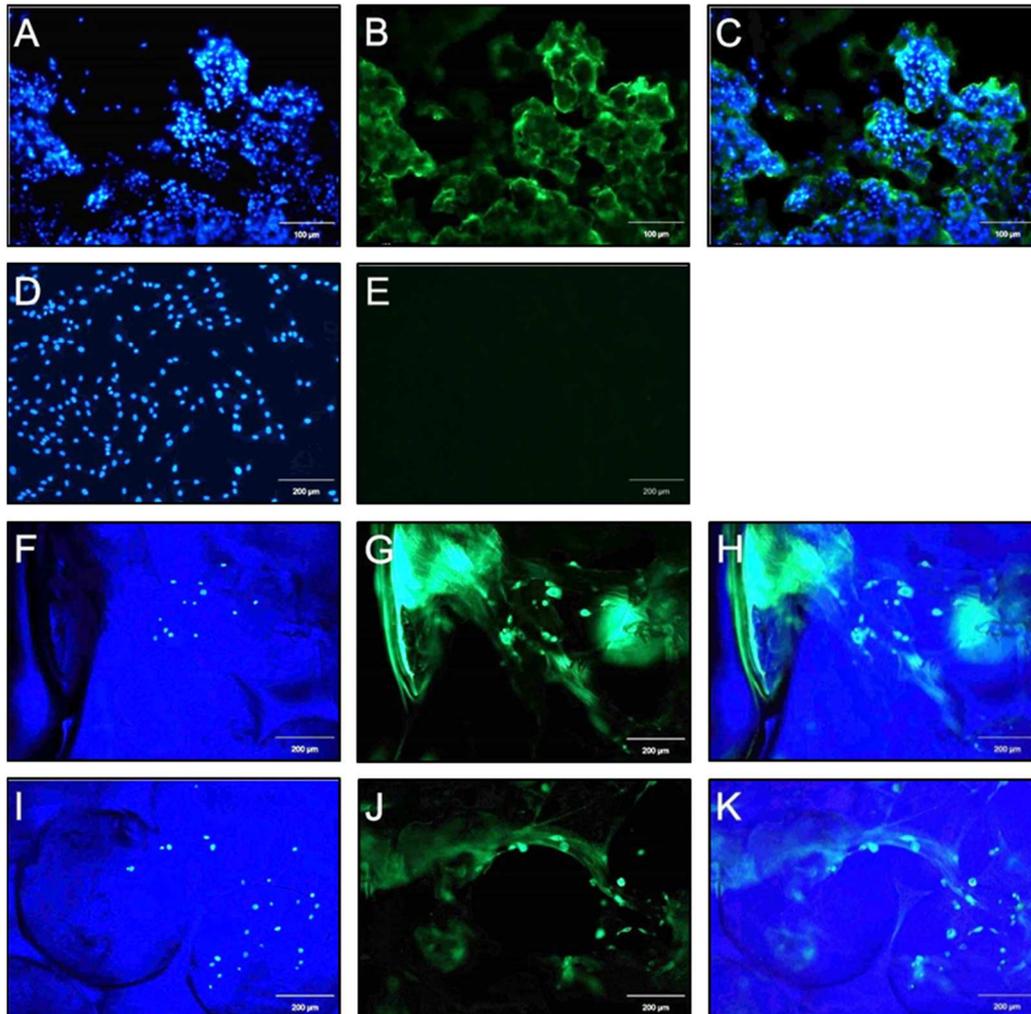
Um eine grundlegende Aussage über die Lebensbedingungen der Parotiszellen auf den besiedelten Polyurethan-Matrices treffen zu können, wurde neben dem immunhistochemischen Nachweis der Zellstruktur durch Pan-Cytokeratin auch die Funktionalität der Zellen mittels Antikörper überprüft. Dieser Nachweis wurde für  $\alpha$ -Amylase im Zytoplasma durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurden Kryoschnitte von humanem Parotisgewebe herangezogen.

Dabei konnte  $\alpha$ -Amylase dadurch nachgewiesen werden, dass nach dem Kontakt mit Sekundärantikörpern eine grüne Fluoreszenz festzustellen war (Abbildung 17).

Als Negativkontrolle wurden die im Bindegewebe vorkommenden Fibroblasten herangezogen. Eine blaue Fluoreszenz der Zellkerne wurde mittels des DAPI-Farbstoffes sichtbar. Eine weitere Fluoreszenz durch Sekundärantikörper wurde nicht nachgewiesen (siehe Abbildung 16 D, E und Abbildung 17 D, E).

Die Pan-Cytokeratinfärbung stellte sich in den Stichproben aus den 20 untersuchten

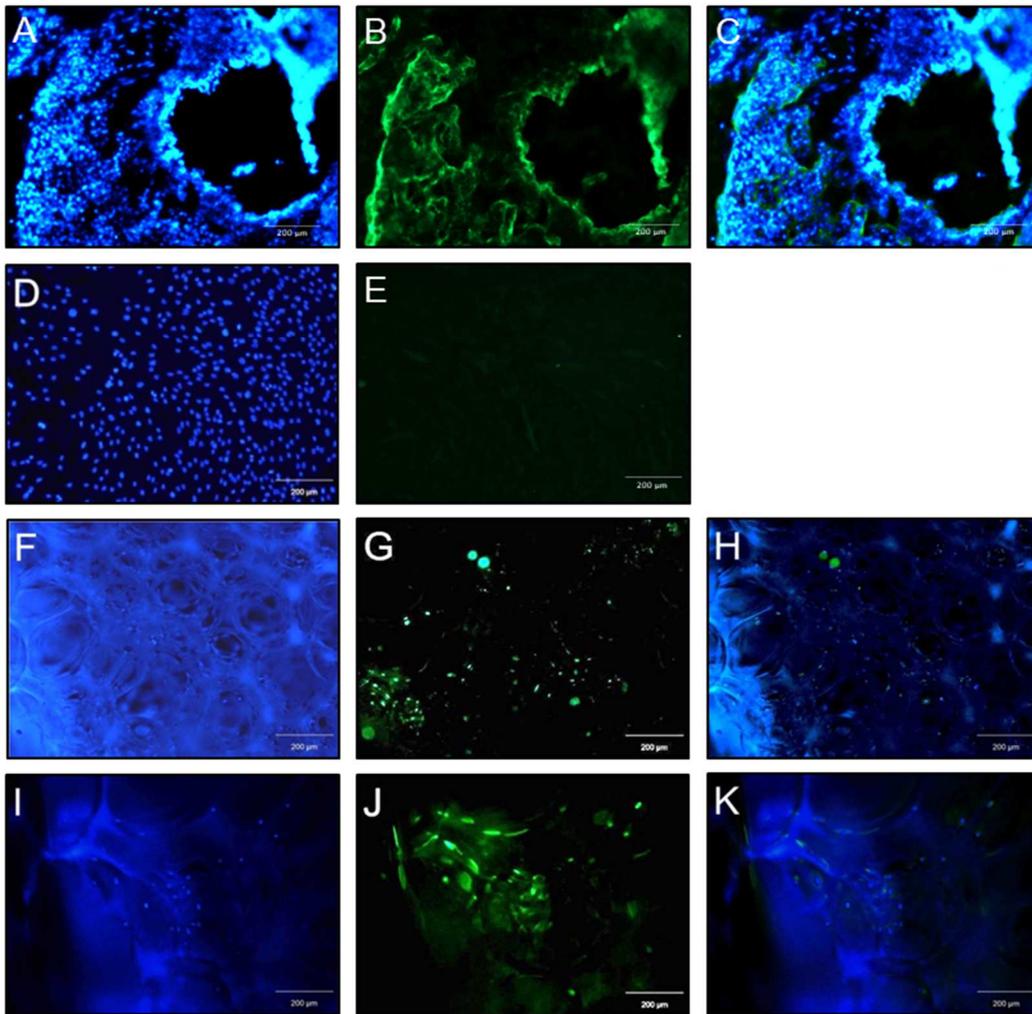


**Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung gegen  $\alpha$ -Amylase (Alexa Fluor 488)**

**(A-C):** Humanes Parotisgewebe im Kryoschnitt als Positivkontrolle. **Bild A:** DAPI-Anfärbung der Zellkerne **Bild B:** Grüne  $\alpha$ -Amylase-Färbung im Parotisgewebe. **Bild C:** Überlagerung von A und B. **(D-E):** Darstellung von Fibroblasten *in vitro* als Negativkontrolle. **Bild D:** DAPI-Anfärbung der Zellkerne. **Bild E:** Keine  $\alpha$ -Amylase-Färbung in Fibroblasten. **(F-K):** Repräsentative Darstellung der kultivierten adhärennten Zellen der Glandula parotidea auf der besiedelten Matrix. **(F, I):** DAPI-Anfärbung der Zellkerne. **(G, J):** Grüne  $\alpha$ -Amylase-Färbung in den kultivierten Parotiszellen von UT7 (**Bild G**) und von UT14 (**Bild J**) mit sichtbarer grüner Autofluoreszenz des Fibrinogen-Thrombin-Gemisches. **(H, K):** Überlagerung von **F+G** und **I+J**.

Personen als stabil konstanter Marker dar. Die Varianz der grünen Fluoreszenz (Sekundärantikörper Alexa Fluor 488), die visuell überprüft wurde, war sehr gering (siehe

Abbildung 16 und Abbildung 17). Das Wasserkanalprotein Aquaporin 5 wurde *in vitro* nicht immunhistochemisch nachgewiesen.

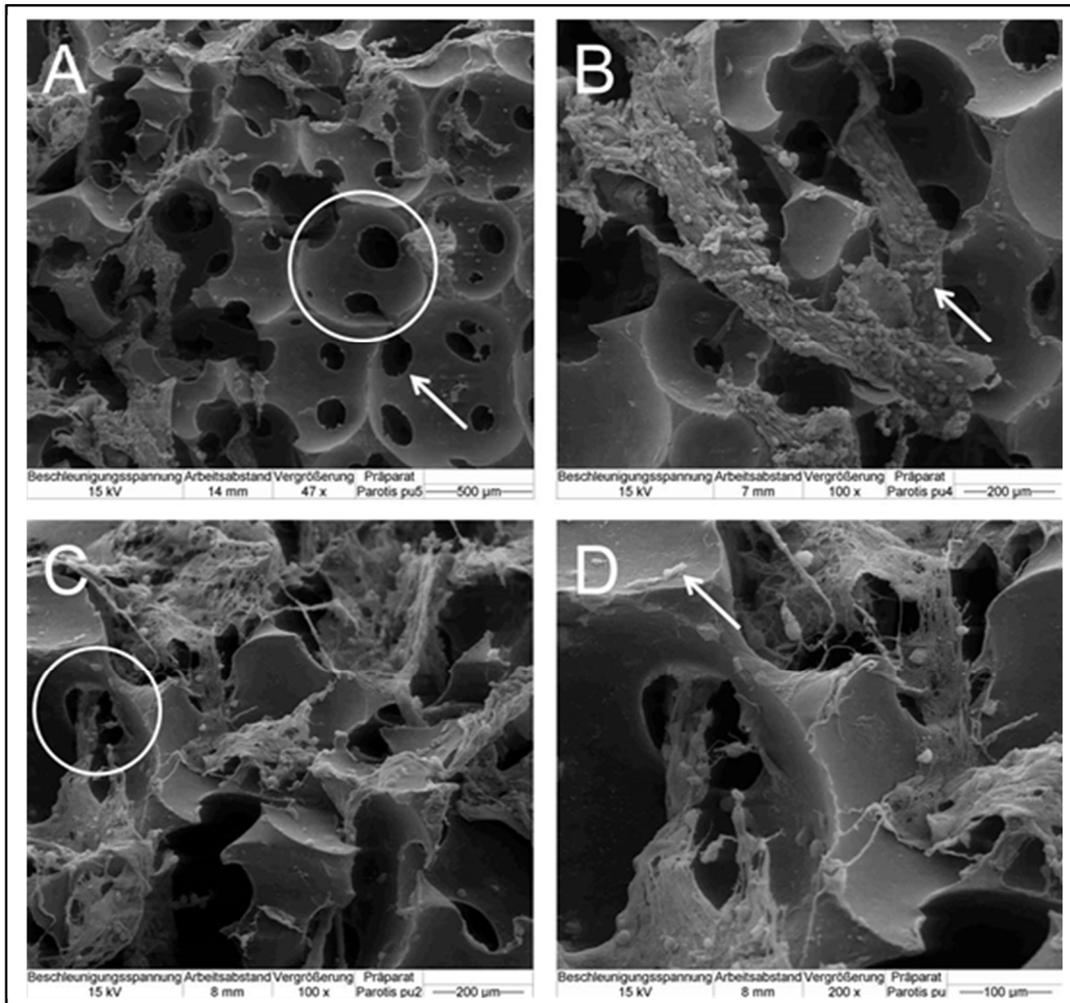


**Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung gegen Pan-Cytokeratin (Alexa Fluor 488)**  
**A-C):** Humanes Parotisgewebe im Kryoschnitt als Positivkontrolle. **Bild A):** DAPI-Anfärbung der Zellkerne. **Bild B):** grüne Pan-Cytokeratin-Färbung im Parotisgewebe. **Bild C):** Überlagerung von A und B. **(D-E):** Fibroblasten *in vitro* als Negativkontrolle. **Bild D):** DAPI-Anfärbung der Zellkerne. **Bild E):** Keine Färbung in den Fibroblasten gegen Pan-Cytokeratin. **(F-K):** Repräsentative Darstellung der kultivierten adhärennten Zellen der Glandula parotidea. **(F, I):** DAPI-Anfärbung der Zellkerne mit blauer Hintergrundluminiszenz der Matrix. **(G, J):** grüne Pan-Cytokeratin-Färbung in Parotiszellen von UT7 (**Bild G**) und von UT14 (**Bild J**). **(H, K):** Überlagerung von **F+G** und **I+J**.

### 3.2.2 Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der besiedelten Konstrukte zum Untersuchungstag 7

Die Fotoaufnahmen in Abbildung 18 entstammen einer besiedelten PUR-Matrix zum Untersuchungstag 7. Zu sehen sind ovale bis kreisförmig angeordnete Vertiefungen, die sich als Poren an der Oberfläche jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen Poren befinden. Dies stellt die synthetische Matrix des PUR-Schaums dar. Die

Poren zeigen jeweils mindestens einen Verbindungstunnel (sogenannte interkonnektive Poren), der sie miteinander verbindet.



**Abbildung 18: Besiedeltes Konstrukt in Rasterelektronenmikroskopdarstellung**

**Bild A:** besiedeltes PR Untersuchungstag 7; Übersicht des besiedelten PUR; Kreis markiert eine an der Oberfläche liegende Pore. Pfeil weist auf einen Verbindungstunnel hin **Bild B:** besiedeltes PUR Untersuchungstag 7; flächig streifige Zell-Thrombin-Suspension auf der Matrix; Pfeil markiert die übertragenen in kugelige Form dargestellten Parotis-Zellen **Bild C:** besiedeltes PUR Untersuchungstag 7; zusätzlicher Ausschnitt Zell-Thrombin-Suspension; Kreis markiert die Interkonnektivität der Poren **Bild D:** besiedeltes PUR Untersuchungstag 7; Zell-Thrombin-Suspension; Pfeil markiert Verunreinigungen bzw. kleine Fibrinabsprengungen.

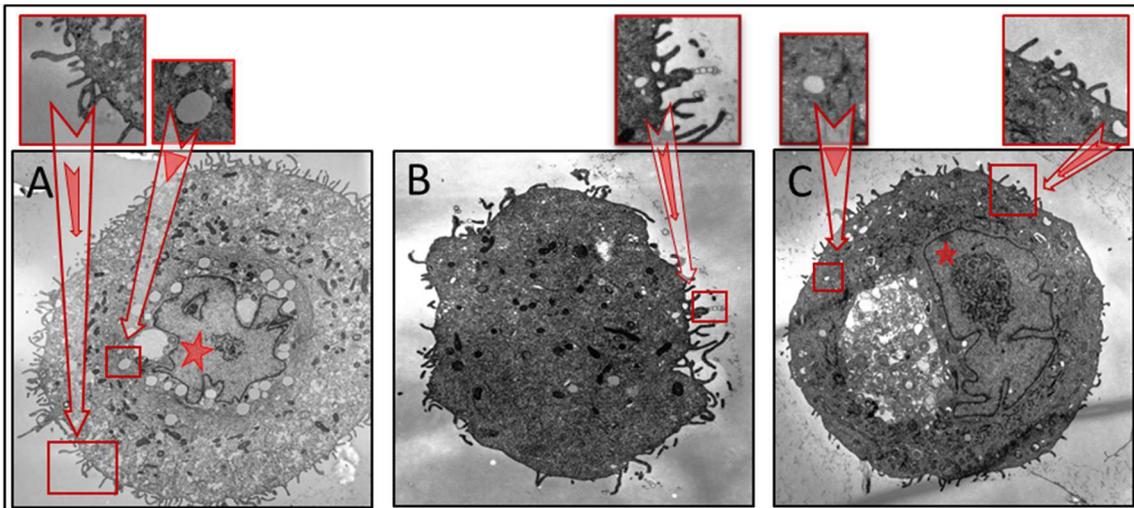
Exemplarisch zeigt sich oberhalb der Bildmitte, wie vier verschiedene oberflächliche Poren mit einer darunter liegenden kommunizieren.

Auf der Unterseite sind weitere Verbindungen zu anderen Poren dargestellt. Die Bilderserie zeigt in zunehmender Vergrößerung das gut sichtbare Zell-Fibrin-Gemisch, welches sich gegenüber dem Kunststoff abhebt. Durch seine stark haftende Konsistenz schmiegt sich die Suspension aus Zellen und Thrombin-Fibrinogen an die Oberflächenstruktur an. Man erkennt deutlich, wie die anfänglich liquide Substanz durch die Porenverbindungen in das Schwämmchen eindringt. Auf der Dispersion sind ovale Strukturen erkennbar, die sich in den Aufnahmen als Parotiszellen darstellen. Einige

wenige Zellen sind auf der PUR-Matrix zu sehen. Die einzelnen kleinen länglichen Elemente auf der Polyurethanoberfläche sind Verunreinigungen oder kleine Fibrinabsprengungen.

### 3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der besiedelten Konstrukte zum Untersuchungstag 14

Das Ziel *in vitro* kultivierte, humane Parotiszellen darzustellen, konnte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie erreicht werden. Hierbei wurden Bilder von einzelnen Zellen fotografisch fixiert (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen** von Untersuchungstag 14 entnommenen *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen (Bild A, B und C:  $\Leftrightarrow$  2,5  $\mu$ m). Mit einem Pfeil sind die Zellfortsätze auf der Plasmamembran markiert, In Bild A und C ist eine Zelle mit einem Zellkern zu sehen, durch einen Stern markiert. In Bild A und C sind zusätzlich Vesikel im Zytoplasma abgebildet, durch Dreieck markiert.

Diese entstammen jenen Konstrukten, die am Besiedlungstag 14 entnommen wurden. Wie man in Abbildung 19 erkennen kann, weisen die Zellen an der Oberfläche der Plasmamembran Zellfortsätze auf. Im Inneren lassen sich einige Vesikel neben Fettschlüssen erkennen. Alle Zellen weisen einen Zellkern sowie einen Nukleolus auf.

### 3.3 Nachweis von $\alpha$ -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 7 mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Nach dem einstündigen Prozess der PCR konnte DNS von GAPDH, EF1 $\alpha$  sowie Cytokeratin 7 in den Proben in ausreichendem Maße nachgewiesen werden. Einen im Mittelwert erhöhten  $C_t$ -Wert zeigte die  $\alpha$ -Amylase. Aquaporin 5 konnte in den Proben nicht sicher identifiziert werden, da bei einem  $C_t$ -Wert  $\geq 38$  von einer nicht existenten

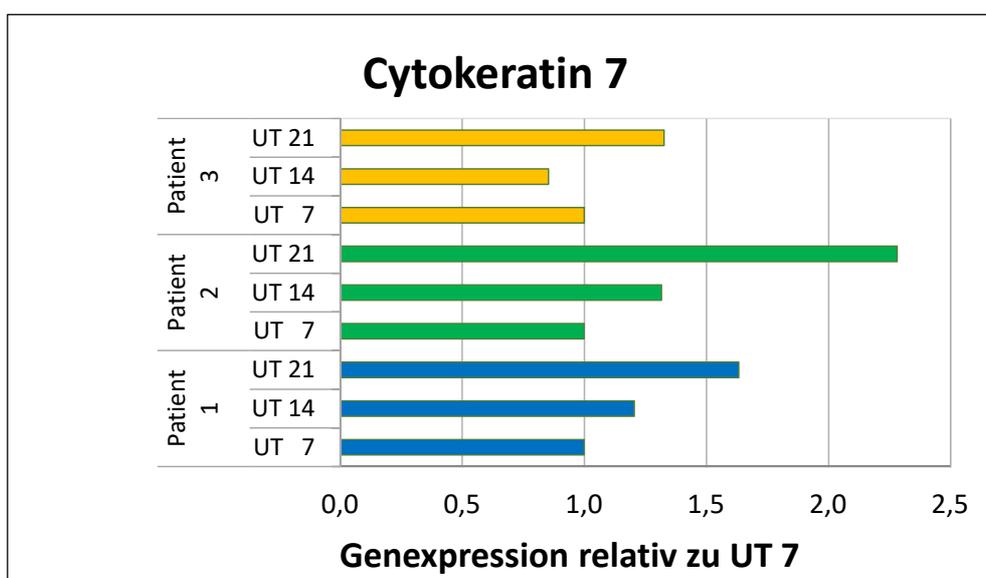
Genexpression ausgegangen werden musste. Um einen Vergleich zwischen dem kultivierten und nativen humanen Parotisgewebe zu erhalten, wurden die Mittelwerte der  $C_T$ -Werte der 3 Patienten von Passage 1-3 denen zweier Patienten A+B gegenübergestellt. In der folgenden Tabelle 6 sind diese Werte zu sehen.

**Tabelle 6: Durchschnittliche  $C_T$ -Werte aller Passagen der Patienten 1-3**

- = keine Untersuchung des nativen Parotisgewebe mit EF1 $\alpha$ , als endogene Kontrolle diente GAPDH.

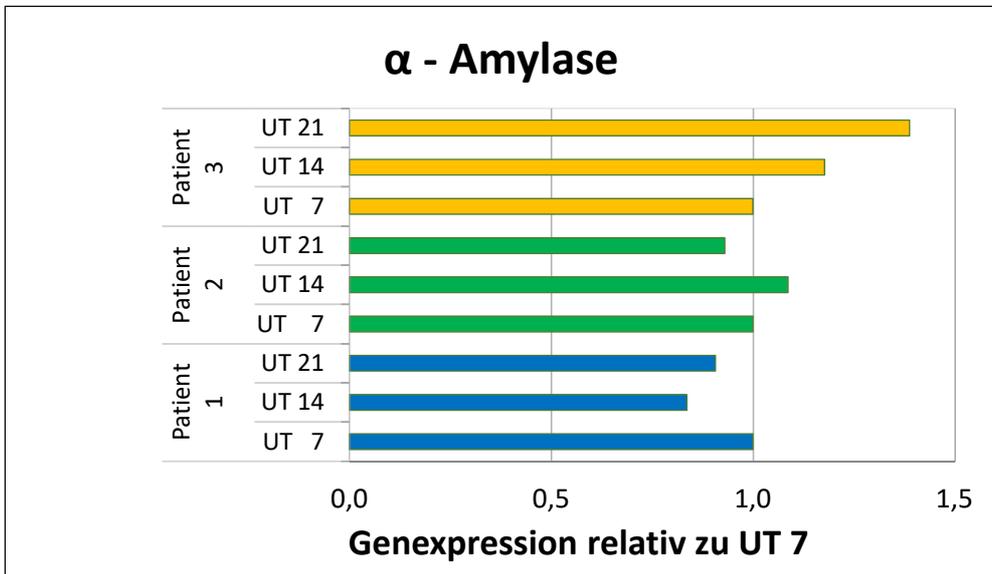
Primer	$C_T$ -Werte KHPZ (kultivierte humane Parotiszellen)	$C_T$ -Werte HPG (natives humanes Parotisgewebe)
Cytokeratin 7	24,74	19,89
$\alpha$ -Amylase	31,08	23,58
Aquaporin 5	37,84	38,20
GAPDH	22,54	24,79
EF1 $\alpha$	19,11	-

Für den jeweiligen Patienten wurde unter Bezugnahme der Housekeeper GAPDH und EF1 $\alpha$  eine Normalisierung für die 3 Entnahmetage vorgenommen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 9-11 im Anhang Kapitel 6.1, Tabellen der Messergebnisse aufgeführt. Für das native humane Parotisgewebe wurde lediglich die interne Kontrolle mit GAPDH durchgeführt. Stellt man die durchschnittliche Genexpression von  $\alpha$ -Amylase der KHPZ Werten der aus der Arbeitsgruppe stammenden, gemittelten 2D-Kultur von

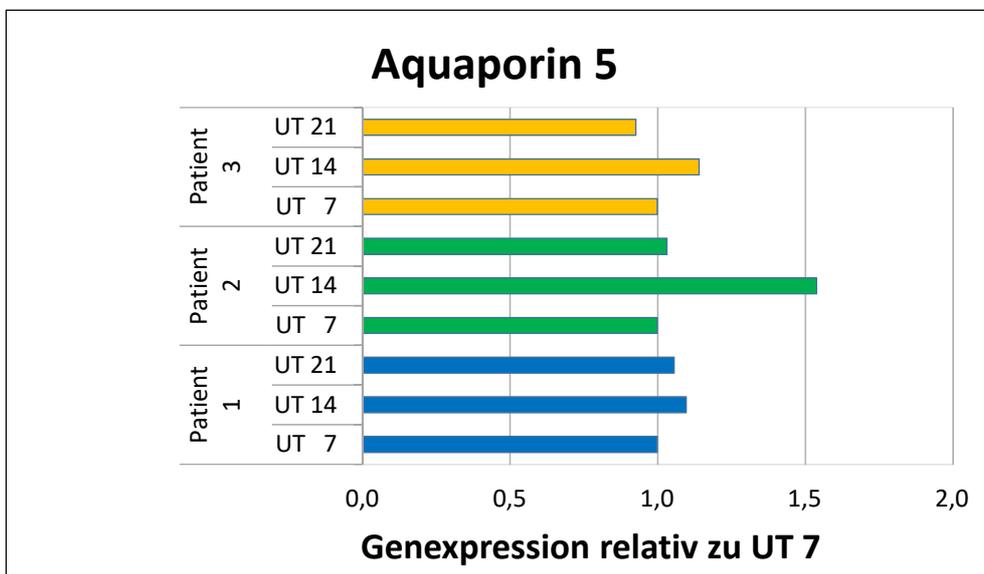


**Abbildung 20: Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Cytokeratin 7**  
Darstellung der Werte von Patient 1-3 über die UT7-21. Die Änderungen der Genexpression von UT14 und UT21 sind relativ zum Basiswert von UT7 zu sehen.

Zellkulturflaschen gegenüber, so zeigen sich naheliegende Ct-Werte von 31,08 zu 31,27. Zur bildlichen Darstellung der gewonnenen Werte wurde die Vorgehensweise, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben, angewandt. Das Ergebnis der Proben des UT7 wurde zur Normierung der Graphen = 1 gesetzt.



**Abbildung 21: Graphische Darstellung der relativen Genexpression von α - Amylase**  
Darstellung der Werte von Patient 1-3 über die UT7-21. Die Änderungen der Genexpression von UT14 und UT21 sind relativ zum Basiswert von UT7 zu sehen.



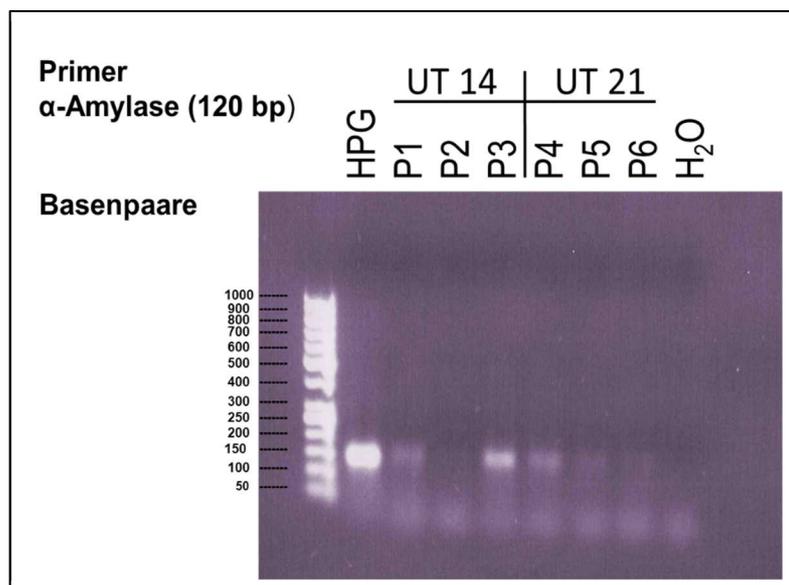
**Abbildung 22: Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Aquaporin 5**  
Darstellung der Werte von Patient 1-3 über die UT7-21. Die Änderungen der Genexpression von UT14 und UT21 sind relativ zum Basiswert von UT7 zu sehen.

Die größte Differenz der relativen Genexpression war bei Patient 2 für Cytokeratin 7 am UT21 mit dem Wert 2,28 festzustellen. Bei einer maximalen Abweichung von 0,9 Punkten konnte eine stabile Genexpression der Gene Cytokeratin 7, α-Amylase und

Aquaporin 5 der drei Patienten angenommen werden, wie in der Abbildung 20, Abbildung 21 und Abbildung 22 grafisch dargestellt.

Zur Überprüfung der durchgeführten PCR wurde exemplarisch eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die dabei genauer in den Fokus genommenen Zielgene waren  $\alpha$ -Amylase und Aquaporin 5. Neben den untersuchten Proben der Patienten wurde dazu humanes Parotisgewebe als Positivkontrolle, GAPDH als Housekeeping-Gen und Wasser als Negativkontrolle benutzt. Nach 60 Minuten konnten Banden in unterschiedlicher Färbung identifiziert werden. Zum Abgleich wurde eine DNS-Leiter herangezogen,

die sich aus 15 chromatographisch aufgereinigten und einzelnen DNS-Fragmenten in einem Intervall von 50-1000 bp zusammensetzten. Die dünnen, flauen, zum Teil durchscheinenden Banden bestätigten die gewonnenen Werte der Real-Time-PCR. Die  $\alpha$ -Amylase war allerdings nur in geringer Menge vorhanden und das Aquaporin 5 war kaum darstellbar (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23: Gelelektrophorese von 6 Proben zum Nachweis spezifischer Gene für GAPDH,  $\alpha$ -Amylase und Aquaporin 5.**

Im Bild von links nach rechts: die DNS-Leiter, die Positivkontrolle (GAPDH), Probe 1-3  $\alpha$ -Amylase von UT14 unterschiedlicher Patienten, Probe 4-6  $\alpha$ -Amylase von UT21 unterschiedlicher Patienten, ganz rechts die Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O), am unteren Rand des Gels verschwommene Bereiche der Primerwolken.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die primär adhärennten Parotiszellen blieben bis zu 21 Tagen nach Übertragung in der Polyurethan-Matrix stabil. Durch die Analyse via Sandwich-ELISA konnte  $\alpha$ -Amylase spezifisch für Speicheldrüsen im Überstand nachgewiesen werden. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten eine Abnahme der zu registrierenden  $\alpha$ -Amylase-Werte.

In der histologischen Aufarbeitung durch die Technik der Fluoreszenzmikroskopie konnte die Vitalität der humanen Parotiszellen auf der besiedelten Matrix mit der Fluorescein-Diacetat-Ethidiumbromid Färbung für die Untersuchungstage 7 und 14 nach-

gewiesen werden.  $\alpha$ -Amylase und Pan-Cytokeratin waren in den kultivierten Parotiszellen vorhanden und konnten mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz dargestellt werden. Für die HE-Färbung konnten weder Kryoschnitte noch Wachsschnitte erstellt werden. Nach einem Ablauf von 7 Tagen bildeten sich adhärente Zellen in kugelförmiger Form, die auf der besiedelten Matrix mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie abgebildet werden konnte. In der Transmissionselektronenmikroskopie konnten Zellen, die Zellfortsätze ausgebildet hatten, nach 14 Tagen gesichtet werden. Das Verfahren der Real-Time PCR erbrachte den Nachweis einer Genexpression für  $\alpha$ -Amylase. Cytokeratin 7 war über alle Untersuchungstage feststellbar. Die Gene von Aquaporin hingegen wurden statistisch nicht ausgewertet, da nur eine geringe Menge davon detektiert werden konnte.

In der Zusammenfassung der einzelnen Untersuchungsergebnisse lässt sich feststellen, dass die besiedelten Konstrukte bis zum 21. Tag der Kultivierung Zellen mit Vitalität und Nachweis für  $\alpha$ -Amylase aufwiesen. Die Anzahl der Zellen, die während der Kultivierungsdauer mikroskopisch erfasst werden konnten, war rückläufig. Die nachgewiesene Konzentration der Amylase zeigte sich regressiv.

## 4 DISKUSSION

Die strahleninduzierte Xerostomie ist ein bekanntes Problem für betroffene Menschen mit Tumoren in Kopf und Hals, die durch Radiotherapie behandelt worden sind. Auch im Bereich der Autoimmunerkrankungen ist die Mundtrockenheit ein belastendes Symptom. Die Reduzierung der Nebenwirkung war bereits innerhalb der ersten Dekade des 21. Jahrhunderts Gegenstand intensivster Forschung. JENSEN *et al.* untersuchte retrospektiv Arbeiten in einem Zeitraum von über 20 Jahren, die mit der Bestrahlungstechnik der IMRT und medikamentöser Therapie Xerostomie bzw. Speicheldrüsenunterfunktion minimieren konnten (Jensen *et al.*, 2010). Die Übersichtsarbeit von NELSON *et al.* setzte sich mit den unterschiedlichen Zellen und vorhandenen Zelllinien auseinander, welche sich zur Anzucht einer Speicheldrüse eignen würden (Nelson *et al.*, 2013).

Ziel dieser Arbeit war, den Nachweis zu führen, dass entnommene Parotiszellen als Monokultur auf Polyurethan ohne Funktionsverlust wachsen würden. Aus operativ erlangtem Parotisgewebe wurde *in vitro* adhärenente Parotiszellen gewonnen und mittels einer Fibrin-Thrombin-Suspension auf eine Polyurethan-Matrix übertragen. Untersucht wurde die Vitalität der Zellen zu festgelegten Zeiten während der Kultivierung *in vitro* und nach Übertragung. Das Konstrukt wurde nach 1-3 Wochen mikroskopisch, biochemisch und durch Elektronenmikroskopie analysiert.

### 4.1 Humane Parotiszellen *ex vivo*

In den aktuellen wissenschaftlichen Arbeiten zeigt sich, dass die Nutzung von unmittelbar zuvor einem Patienten entnommenen Speicheldrüsenzellen die besten Voraussetzungen bieten, eine künstliche Speicheldrüse herzustellen. Im Vergleich zu den tumorassoziierten Zelllinien HSY oder HSG (Wang *et al.*, 2009) oder den unsterblichen Zelllinien der Submandibularspeicheldrüse (SMG) -C6 bzw. -C10 (Vasquez *et al.*, 2009), sind die Zellen in der vorliegenden Arbeit dem natürlichen Gewebe sehr viel ähnlicher, bzw. nahezu identisch (Warner *et al.*, 2008). Zusätzlich lassen sich diese Zellen *in vitro* verändern, um sie danach in den Körper reimplantieren zu können. Ein großes Problem, das sich im Laufe der Forschungen stellte, war die morphologische Azinus-Form *in vitro* herauszubilden, ohne die eine hypotone Speichelbildung morphologisch unmöglich ist. Hinzu kommt, dass die Zellen die Tendenz zur Dedifferenzierung haben, wenn sie auf einer Plastikoberfläche angezchtet werden (Szlavik *et al.*, 2008).

Darüber hinaus reagierten die zu passagierenden Zellen mit Apoptose, wenn sie in einer Einzelzellsuspension aufgeteilt wurden (Walsh *et al.*, 1998).

Festgestellt werden konnte auch, dass einzelne menschliche Parotiszellen in der Lage sind, sich in Azinus- oder Gangzellen zu differenzieren, wenn sie in einer 3D-Umgebung aufgewachsen sind (Joraku *et al.*, 2007). Die humanen Azinuszellen der Parotis wiesen dabei  $\alpha$ -Amylase, AQP5 und Tight Junction Proteine auf, wenn diese in Growth Factor Reduced (GFR) Matrigel gezüchtet wurden (Joraku *et al.*, 2007). Dieses Extrakt fördert die Zelldifferenzierung und wird u. a. auch verwendet, um die Aktivität von invasiven Tumorzellen zu messen (Benton *et al.*, 2011; Hughes *et al.*, 2010). *In vivo* wird die Substanz zur Messung angiogener Inhibitoren und Stimulatoren genutzt, um das Überleben des Transplantats zu verbessern, beschädigtes Gewebe zu reparieren und das Tumorstadium zu erhöhen (Benton *et al.*, 2011). Eine Studie der Arbeitsgruppe um PRADHAN *et al.* konnte nachweisen, dass auf einem Hydrogel auf der Basis von Hyaluronsäure (HS) angezüchtete Parotiszellen, die Fähigkeit besaßen, Tight Junctions in Acini zu bilden. Dadurch schafften sie zentrale Lumen und stellen ebenfalls  $\alpha$ -Amylase her (Pradhan *et al.*, 2010).

Der Arbeitsgruppe um MARIA im Jahr 2012 gelang es, Oberflächenmarker, die normalerweise im Zusammenhang mit Stammzellen eingesetzt werden, auch zur Ortung von spezifischen Subtypen der Azinuszellen zu nutzen. Die spezifischen Subtypen unterschieden sich dabei in ihrer Sekretart, waren also mukös oder serös (Maria *et al.*, 2012).

Eine frühere Arbeit von TRAN *et al.* aus dem Jahre 2006 untersuchte Parotiszellen von Rhesusaffen, die auf einer Plastik-Oberfläche angesiedelt worden waren. Dabei blieb die Fähigkeit der Zellen apikal Tight Junctions auszubilden und basolateral  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpen auszuweisen erhalten. Dies lag an dem strukturellen und morphologischen Aufbau =Polarisierung, die noch weitere Vorteile besitzt. Ein weiterer Vorteil dieser Zellen ist es, dass sie mit einem Vektor des Adenovirus transifiziert werden können, wodurch sie in die Lage sind AQP1 herzustellen (Tran *et al.*, 2006).

Daraus ergaben sich wiederum weitergehende Forschungsmöglichkeiten, die allesamt das Ziel verfolgten, den Speichel in seiner Zusammensetzung zu synthetisieren. Dabei zeigten zunächst die Studien, dass Speicheldrüsenzellen in einen lebenden Organismus verpflanzt werden können. So wurde im Jahr 2005 von der Arbeitsgruppe um JORAKU *et al.* menschliches Speicheldrüsenengewebe auf Matrices, basierend auf Polyglycolsäure, unter die Haut in eine athymische Maus transplantiert (Joraku *et al.*,

2005). Später wurden die Zellträger aus der Maus zurückgewonnen. In diesen Proben konnten differenzierte azinäre Strukturen nachgewiesen werden (Joraku *et al.*, 2005). In einer anderen Studie, die von SUGITO herausgegeben wurde, wurden markierte SMG-Zellen der unsterblichen Submandibularzelllinie in eine atrophische Speicheldrüse transplantiert. Einige Wochen später konnten die gekennzeichneten Zellen in einem großen Bereich innerhalb der Speicheldrüse, nahe der Acini und Gänge, nachgewiesen werden. Die Zellen waren sowohl selektiv angezogen als auch lokal begrenzt auf den beschädigten Bereich, ohne normales umliegendes Gewebe zu beeinflussen (Sugito *et al.*, 2004).

PRADHAN *et al.* gelang es im Jahre 2013, Parotiszellen auf einem HS-Hydrogel anzuzüchten. Diese Zellen waren in der Lage, sowohl Speichel als auch phänotypische Proteine zu produzieren (Pradhan-Bhatt *et al.*, 2013). Als Problem dabei stellt sich nach wie vor die Polarität der Zellen dar, insbesondere, was die Ausrichtung zum Lumen betrifft. In anderen Studien ließ sich zeigen, dass die Verzahnung der EZM sowie der Austausch mit den Myoepithelzellen eine große Rolle bei der richtigen Einbindung und der Ausrichtung der Zellen spielen (Ayad *et al.*, 1998).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die kultivierten humanen Parotiszellen die richtigen Zelltypen darstellen, um eine künstliche Speicheldrüse herzustellen. Die morphologische Struktur, die Polarisierung im Zellaufbau, die Möglichkeit der Zelldifferenzierung, die unkomplizierte Transplantation sowie das Potential, auf Neurotransmitter zu reagieren, lässt für diese Zellart eine positive Prognose erwarten. Es ist dabei jedoch zu berücksichtigen, dass diese Ergebnisse lediglich im Labor auf dem halbliquiden Matrigel erzielt wurden. Auf Grund des karzinogenen Ursprungs wird das GFR Matrigel lediglich, wie bereits erläutert, weitgehend nur präklinisch eingesetzt. Die Resultate des im vorliegenden Projekt verwendeten Polyurethans zeigen, dass eine Anzüchtung der Zellen auf dem Kunststoff über 21 Tage möglich ist. Sieht man die Ergebnisse im Vergleich zu den oben genannten Studien auf Matrigel oder dezellularisiertem Schweinedarm als Matrix bei BURGHARTZ (2018), liegen die Ergebnisse hinter denen der anderen Trägersubstanzen. Sowohl die Proliferation, der Nachweis von Amylase und das Vorhandensein von AQP5 zeigen auf anderen Matrices günstigere Ergebnisse. Dass Zellen unter Laborbedingungen prosperieren, konnten Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Zelllinien bereits in der Vergangenheit zeigen. Im Jahre 1990 benutzte BUCHANAN *et al.* primäre Zellkulturen von Schweißdrüsen (Buchanan *et al.*, 1990). 1987 konnten menschliche Nasenepithelzellen durch BOUCHER *et al.* zur Etablierung

einer Zelllinie verwendet werden (Boucher *et al.*, 1987). Zelllinien gewährleisten eine gewisse Langlebigkeit sowie eine stabile Differenzierung. Was den Vergleich mit Zellen *in vivo* schwierig gestaltet, ist die Tatsache, dass es sich bei den verwendeten Zelllinien um transformierte Zellen oder um Zellen aus Tumoren handelt. Daraus ergeben sich Unterschiede bezüglich Gewebestruktur, Zellzusammensetzung und Zelldifferenzierung (Merkle *et al.*, 1998). Auch die teilweise großen Unterschiede im Wachstumsverhalten können destabilisierend auf das gesamte Experiment wirken. Gerade die Proliferation des Frischgewebes variiert von Person zu Person in erheblichem Maße (Singh *et al.*, 1991).

Dagegen weist humanes Frischgewebe bzw. daraus zu Miniorgankulturen (MOKs) weiterverarbeitetes Gewebe erhebliche Vorteile gegenüber der Zelllinie auf, da sich die Zellen weitgehend in ihrem natürlichen Milieu entwickeln konnten. Auf dieses Faktum wiesen auch BATES *et al.* hin, indem sie zeigten, dass die interzellulären Signalwege einen nachweisbar großen Einfluss auf das Überleben der Zellen haben (Bates *et al.*, 2000). Daher ist leicht nachvollziehbar, dass im Hinblick auf die Machbarkeit einer Reimplantierung im Rahmen dieser Arbeit, der Einsatz von humanem Frischgewebe, bzw. die daraus zu MOKs weiterverarbeiteten Zellkolonien bevorzugt wurden.

SINGH *et al.* untersuchten das Phänomen eines ungenügenden Zellwachstums *ex vivo*. Dabei stellten sie fest, dass die Minderung des Wachstums der einzelnen Parotiszellen auch mit einem DNS-Schaden durch Alterung der Zellen in Verbindung stehen kann. Sie untersuchten einen Anstieg der DNS-Schäden in Abhängigkeit vom zunehmenden Alter in einer Patientenkohorte, die ausschließlich aus Personen bestand, die das 60. Lebensjahr vollendet hatten (Singh *et al.*, 1991). Dabei besteht jedoch das Problem, dass epidemiologisch das Hauptmanifestationsalter der an Tumoren erkrankten Personen genau in diesem Altersbereich liegt (Robert-Koch-Institut, 2016).

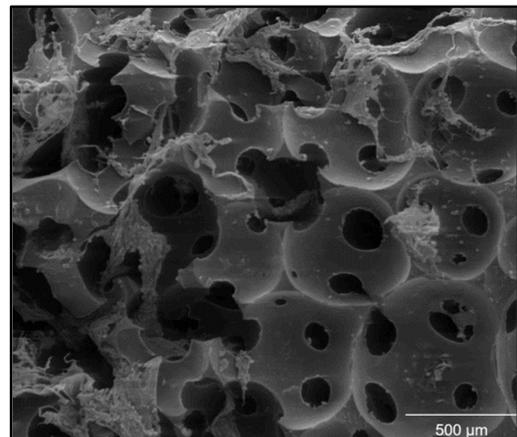
Dennoch zeigten KLEINSASSER *et al.*, dass die MOK ein tragfähiges System *in vitro* darstellen, welches in der Lage ist, DNS-Schäden durch Umwelteinflüsse ähnlich einem lebenden Objekt zu simulieren (Kleinsasser *et al.*, 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch HIRAKI *et al.*; allerdings wurden von ihnen auch die Schwierigkeiten beschrieben, die den Zellkulturen aus Speicheldrüsenzellen inhärent sind. Sie nannten dabei an erster Stelle die limitierte Proliferation und Differenzierung sowie auch die absinkende Vitalität der Zellen. Dem Problem der Zelldifferenzierung wirkten HIRAKI *et al.* durch die Zugabe von Kalzium und Tetradekanoylphorbol 13-Acetat entgegen (Hiraki *et al.*, 2002).

Da durch die Zellwachstum stimulierende Miniorgankultur nicht nur reine Parotiszellen, sondern auch vorhandene Fibroblasten angeregt werden, bedarf es immer, wenn die MOK-Technik eingesetzt wird, einer genauen Auswahl der adhärennten Zellen. Mit diesen wurde die Arbeit dann weitergeführt. Gerade für den indirekten Nachweis durch ELISA war dies eine Variable, die es durch Selektion zu vermindern und im besten Falle zu vermeiden galt. Das Problem besteht dabei konkret darin, dass die nachgewiesene  $\alpha$ -Amylase ein Produkt der Epithelzelle selbst ist. Wenn die Konzentration des nachzuweisenden Stoffes niedrig ausfällt, kann es dann entweder daran liegen, dass die Zellen davon wenig produzieren oder dass die Zellen, die auf der Matrix angezüchtet wurden, sowohl Speicheldrüsenzellen als auch Fibroblasten waren.

#### 4.2 Humane Parotiszellen *in vitro*

EYRICH *et al.* gelangten im Jahre 2007 zu der Erkenntnis, dass ein Gemisch aus Knorpelzellen und Fibrin-Gel eine bessere Anzüchtung sowie eine gleichmäßigere Ausbildung an EZM gegenüber einem Aufbringen ohne Fibrin gewährleisten konnte (Eyrich *et al.*, 2007). Die Zellen brauchten nach ihrer Ablösung einen Zeitraum von mindestens einem Tag, um wieder eine Adhärenz mit dem Untergrund bilden zu können. Des Weiteren zeigte sich im Lichtmikroskop, dass beim Aufbringen der Zellen ohne Fibrin-Gemisch, diese bei Hinzugabe von Nährmedium fast komplett von der Matrix gespült wurden. Auf den REM-Bildern war zu beobachten, dass sich die meisten Zellen auf dem Fibrin Gemisch befanden. Hingegen siedelten sich auf dem Polyurethan nur eine geringe Anzahl Zellen an. Ganz offenbar fanden die Zellen bessere Bedingungen zur Anheftung auf dem Fibrin-Thrombin Gemisch vor.

Wie auf dem Elektronenmikroskop-Bild Abbildung 24 zu erkennen war, boten die an der Oberfläche liegenden Verbindungen zwischen den Poren ausreichend Platz für die Zell-Proliferation. Eine Interkonnektivität scheint gegeben. Die Hypothese, dass durch zu enge Verbindungen zwischen den Poren

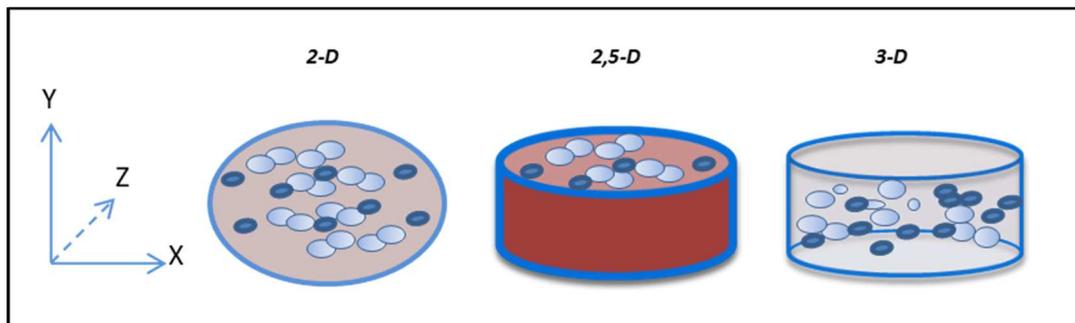


**Abbildung 24: REM-Übersichtsbild des besiedelten Konstruktes**

Die Zell-Thrombin-Suspension bedeckt anteilig die Oberfläche des Konstruktes. Die Zellen sind vorwiegend in kugelförmiger Form auf der Fibrin-Thrombin-Suspension zu sehen. Die oberflächlich liegenden Verbindungen zwischen den Poren stellen sich gut sichtbar gegenüber den einzelnen Parotiszellen dar. Im linken unteren Bereich des Bildes ist eine tiefere, innen liegende Ebene des Konstruktes zu sehen. Ein Unterschied in der Beschaffenheit ist in der Aufnahme nicht festzustellen.

ein verminderter Nährstoffaustausch stattgefunden habe, kann anhand der REM-Bilder nicht bestätigt werden.

Weder eine Behinderung des Wachstums durch räumliche Enge, noch die Vermutung, dass die engen Porenverbindungen eine verminderte Nährstoffversorgung verursachen könnten, lässt sich mit diesen Beobachtungen nachweisen. Dagegen sind Studienergebnisse bekannt, die Wachstum und Migration von Zellen auf einer Trägersubstanz durch unterschiedliche Dichte des Trägermaterials in ihrer Ausbreitung und Ausrichtung beeinflussen können. MAK *et al.* gingen dem Phänomen genauer nach und zeigten, dass eine künstliche Verengung der Ausbreitungsfläche zu einer gerichteten Bewegung von Tumorzellen führen kann (Mak *et al.*, 2011). Theoretisch wäre es also möglich, durch spezifisches Stanzen einen eindimensionalen Gradienten zu erzeugen. Damit könnte es zu einem progredienten Zusammenschluss von Zellen kommen. Von Interesse sind auch die Studien von PRADHAN *et al.* Sie unterschieden die Zellen nach ihrer örtlichen Ausbreitung auf dem Trägermaterial nach 2-D, 2,5-D und 3-D



**Abbildung 25: Graphische Darstellung der Auftragung der Zellen auf einer Matrix aus Hyaluronsäure-Hydrogel**

Der Unterschied in der 3D Darstellung ist die Verteilung der Zellen in allen drei Raumrichtungen gegenüber einer planen Auftragung der Speichelzellen in den übrigen Matrices. Modifiziert nach Pradhan-Bhatt *et al.* (2013).

(siehe Abbildung 25). Im Vergleich der Ergebnisse zwischen dem Hyaluronsäure-Hydrogel und dem Polyurethan zeigte sich, dass die besseren Ergebnisse auf dem Trägermaterial HS-Hydrogel erzielt werden konnten. Dies betraf sowohl die Zellteilung als auch deren Differenzierung (Pradhan-Bhatt *et al.*, 2013). Nur durch die Ausbildung einer basalen und auch apikalen Membran sind die Zellen in der Lage,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - Kanäle in der basolateralen Membran sowie auch Wasserkanäle im apikalen Bereich zu entwickeln. Dieser beschriebene zielgerichtete Aufbau der Zellen ist die Voraussetzung für deren Funktionalität. beschriebene zielgerichtete Aufbau der Zellen ist die Voraussetzung für deren Funktionalität.

### 4.3 Kritische Betrachtung der Ergebnisse anhand der aktuellen Forschungsliteratur

Die eigenen Forschungsergebnisse wurden anhand des aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstandes kritisch beleuchtet. Insbesondere entstanden zwischen der Theorie der wissenschaftlichen Arbeiten und dem realen Verlauf der Experimente gewisse Widersprüche. Es lag somit nahe, den Gründen für diese Widersprüche nachzuspüren. Deshalb sollen im Folgenden alle wesentlichen Schritte, die zu den hier dargestellten Ergebnissen führten, noch einmal kritisch hinterfragt und in den Kontext der aktuellen Forschungsliteratur gestellt werden.

#### 4.3.1 Die Isolation von aktiven Zellen

In den gewonnenen Bildern des Transmissionselektronenmikroskops waren keine Zellen zu finden, die sich aufgrund der Membranstruktur als polarisiert interpretieren ließen. Dagegen konnten nahezu ausschließlich singuläre, kugelige Zellen festgestellt werden. Nur in sehr wenigen Fällen zeigte sich eine Zellansammlung. Ob es sich hier um Acinus-ähnliche Strukturen handelte, war nicht feststellbar.

Durch eine Lebend/Tot Färbung auf FDA/EB Basis konnte gezeigt werden, dass die vorhandenen Zellen vital waren. Die kugelige Form der Zellen lässt sich in ähnlicher Weise in der Arbeit von KOLB beobachten (Kolb, 2018). Die Form der Zellen veränderte sich bei KOLB durch eine geänderte Beschichtung der gleichen Matrix. In dieser Arbeit wurde als Übertragungsmedium das Fibrinogen-Thrombin-Gemisch, in der Arbeit von KOLB Hydrogel zur Zellaufbringung verwendet.

Es zeigt sich, dass für das Tissue Engineering eines komplexen Organs, wie einer Drüse, die Polarisierung der verschiedenen Zellen nach wie vor ein Problem darstellt. Im Arbeitspapier von PRADHAN *et al.* wird unter Bezugnahme auf Studien an apokrinen Drüsen der Mamma spekuliert, dass durch Hinzufügung von Myoepithel eine Polarisierung zu erzeugen wäre (Pradhan-Bhatt *et al.*, 2013). Die Kombination aus diesen beiden Zellarten sollte zu einem gerichteten Aufbau einer funktionsfähigen Drüse führen. In der Arbeit von BURGHARTZ *et al.* aus dem Jahr 2018 wurden humane Speicheldrüsenepithelzellen (hSEZ) als Primärzellen mit mikrovaskulären Endothelzellen (mvEZ) als Kokultur auf dezellularisiertem Schweinedarm als Matrix angesiedelt. In den durchgeführten TEM-Aufnahmen konnten neben Zell-Zell Kontakten auch sekretorische Vesikel dargestellt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es zu einem gerichteten Aufbau der kultivierten Zellen kam (Burghartz *et al.*, 2018).

Denkbar wären auch weitere Versuche mit einem anderen Trägermedium (Woodfield *et al.*, 2005). Es könnte Polyurethan versetzt mit einem Gradienten genutzt werden. Auf diese Weise kann sich rasch eine stabile Struktur herausbilden, die zur Sekretion in ausreichendem Maße befähigt ist. Ist dies gegeben, so ist ab diesem Zeitpunkt eine Untersuchung der Zellkontakte wie Claudin-1, Zonula Occludens-1 oder  $\beta$ -Cadherin sinnvoll.

In zahlreichen Experimenten wurde bestätigt, dass eine *in vitro* gezüchtete und ausreichend funktionierende Parotisspeicheldrüse sehr stark von der Existenz individueller Zellmembranbestandteilen wie Aquaporin und Enzymen sowie  $\alpha$ -Amylase abhängt. Das Enzym der  $\alpha$ -Amylase dient bekanntlich der Spaltung von langkettigen Zuckermolekülen. Es liegt daher nahe, zunächst im ausreichenden Maße Gene zu exprimieren, die dann zur Entstehung des jeweiligen Proteins bzw. Zielstruktur führen. Jedoch ist die Datenlage zu unterschiedlich, um daraus einen Handlungspfad abzuleiten. Zwar konnte in den Versuchen per PCR die  $\alpha$ -Amylase nachgewiesen werden, jedoch nur in einem sehr geringen Umfang. Wollte man also ausreichend Zellen heranzüchten, müsste eine große Anzahl von Zyklen durchlaufen werden.

Die Arbeitsgruppe um JORAKU konnte nachweisen, dass die Anzüchtung von Fibroblasten *in vitro* zu keiner  $\alpha$ -Amylase-Produktion führte (Joraku *et al.*, 2005). Die Forscher schlossen daraus, dass zwar durchaus lebende Parotiszellen auf dem Konstrukt gezüchtet wurden, dass es jedoch nur zu einer geringen Ausbildung des Enzyms gekommen war.

Mit Hilfe von ELISA konnte in der vorliegenden Arbeit die  $\alpha$ -Amylase-Konzentration der adhärennten Zellen festgestellt werden. Im Friedmantest mit 20 Probanden wurde eine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Amylase über eine bestimmte Zeitdauer hinweg dargestellt. Dieses Ergebnis stimmt mit den hier gewonnenen Daten aus der PCR überein. Der höchste gemessene Median im ELISA Test war 4,4 U/l am ersten erhobenen Untersuchungstag. Jede Probe wurde als Duplikat erstellt. Auswertungen einer anderen Patientenkohorte aus der gleichen Arbeitsgruppe zeigten ähnliche Ergebnisse. So konnte die Entstehung des Enzyms auf genetischer Basis durch die PCR und in seiner Erscheinung im Speichel durch ELISA bestätigt werden.

Zieht man den reinen gemittelten  $C_t$ -Wert der  $\alpha$ -Amylase von 31,27 der 2D-Monokultur aus der Arbeitsgruppe zum Vergleich gegenüber dem gemittelten Wert auf PUR kultivierten Zellen von 31,08 heran, so unterscheiden sich diese nur gering. Berücksichtigen muss man jedoch, dass die Werte der 2D-Monokultur gegen CK18 normalisiert

wurde, in der vorliegenden Arbeit jedoch gegen GAPDH und EF1 $\alpha$ . Ein Zusammenhang der fallenden Enzymaktivität und der steigenden C<sub>t</sub>-Werte von  $\alpha$ -Amylase über den Untersuchungszeitraum ist anzunehmen, jedoch nicht signifikant und müsste im Ergebnis einer Wiederholung mit einer größeren Probenanzahl standhalten.

Wie eingangs erwähnt, ist Aquaporin essenziell zur Entstehung eines funktionsfähigen, hypotonen Speichels. Zahlreiche Studien, u. a. von GRESZ und MATSUZAKI zeigten, dass AQP5 an der apikalen Membran des Azinus von Speicheldrüsen vorzufinden ist (Gresz *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 1999). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit insbesondere auf den Nachweis von AQP5 Wert gelegt. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass kein signifikanter Nachweis des Aquaporin 5 an den drei Untersuchungstagen zu erbringen war. Vergleicht man die gewonnenen Daten mit den Ergebnissen der oben genannten Arbeitsgruppen, lässt sich feststellen, dass hier ein signifikanter Unterschied zwischen den messbaren Ergebnissen der Funktionalitätsüberprüfung vorliegt. Diese Arbeitsgruppen arbeiteten jedoch mit einem anderen Trägermaterial auf Hydrogel-Basis (Janebodin *et al.*, 2013; Pradhan-Bhatt *et al.*, 2014). In der Studie von BURGHARTZ *et al.* konnten in 3D-Kokultur hSEZ gezeigt werden, die zum Untersuchungstag 7 und 14 nach Kolonisierung  $\alpha$ -Amylase und Aqp5 in der Immunfluoreszenz ohne wesentlichen Unterschied aufwiesen. Zusätzlich wurde zur Bestätigung funktionierender Zell-Zellkontakte Claudin 1 (Cl1) als Untereinheit des Schlussleistenkomplexes durch Immunfluoreszenz überprüft. In den untersuchten Proben konnte an der Oberfläche der Matrix Cl1 positive Zellen immunhistologisch charakterisiert werden. In nativem Speicheldrüsengewebe kann Cl1 in Duktalzellen nachgewiesen werden. Aus den gewonnenen Ergebnissen dieser Studie lässt sich schlussfolgern, dass eine stabile Differenzierung der Zellen bis zum Untersuchungstag 14 vorlag. Bei näherer Betrachtung der Studie zeigt sich, dass der konstante Nachweis von  $\alpha$ -Amylase und Aqp5 bei Zellen im Kryptengrund zu finden war, die Cl1 positiven Zellen waren örtlich getrennt an der Oberfläche der besiedelten Matrix abgebildet (Burghartz *et al.*, 2018).

Ein möglicher Erklärungsansatz der unterschiedlichen Ergebnisse der vorangegangenen Studien findet sich in der Arbeit von PRADHAN-BHATT aus dem Jahre 2013. Hier wurde von ihrer Arbeitsgruppe die Auswirkungen des Trägermaterials auf die Parotiszellen in Beziehung zu der Zellaufbringung und der dreidimensionalen Ausdehnung des Hydrogels untersucht. Die Studie kam zum Ergebnis, dass die Zellen in einem 3-D Gerüst die besten Ergebnisse erzielten, sowohl was das Wachstum als auch die

Organisation der Zellen betrifft. Zu schlussfolgern ist daher, dass bei komplexen Strukturen, wie einer Speicheldrüse, die räumliche Anordnung der Zellen zueinander einen essenziellen Einfluss ausübt, was u. a. auch PRADHAN-BHATT bestätigt werden konnte (Pradhan-Bhatt *et al.*, 2014). Wie gezeigt, glich der hier praktizierte Versuchsaufbau mit einem 2,5-D-Ansatz dem von PRADHAN-BHATT. Zwar befanden sich beide Zellen auf einer dreidimensionalen Matrix, sie wurden jedoch auf die Oberfläche aufgebracht. Insofern spielt also das Volumen des Trägermaterials keine tragende Rolle.

### 4.3.2 Polyurethan als Trägermedium

Sollen humane Speicheldrüsenzellen *in vitro* kultiviert und klinisch verwendet werden, muss den Zellen eine Matrix geboten werden, die besondere Eigenschaften aufweist. Die Matrix muss bioresorbierbar und hydrophil sein und eine bestimmte Abbauzeit und mechanische Fähigkeiten haben, die dem Verhältnis des zu ersetzenden Gewebes entsprechen (Godbey und Atala, 2002; Peppas und Langer, 1994). Hierzu erscheint das GFR Matrigel zum Einsatz geeignet (Pradhan-Bhatt *et al.*, 2014). Grundsätzlich stellt GFR eine Modifikation des Matrigels dar. Sie ist ein Extrakt aus extrazellulären Matrixproteinen, die auf der Grundlage von der Chondrosarkom-Zelllinie Englebreth-Holm-Swarm (EHS) aus Mäusen gewonnen wird (Kleinman und Martin, 2005). Diese stellt zwar labortechnisch gute Wachstumsbedingungen für Zellen dar, durch die gewonnene Bestandteile aus einem Tumor ist der Einsatz am Menschen jedoch ausgeschlossen.

Das in dieser Untersuchung eingesetzte Trägermaterial  $\epsilon$ -Polycaprolacton der Firma Polymaterials AG (Kaufbeuren, D) ist ein biologisch abbaubarer Kunststoff. Durch das Polycaprolacton weist das synthetisierte Material eine hohe Festigkeit bei gleichzeitiger Elastizität gegenüber anderen Polyol-Gruppen auf. Lt. GUAN *et al.* wird Polyurethan aus PCL in einem relativ langsamen Prozess von 1 bis 1,5 Jahren *in vitro* hydrolytischen abgebaut (Guan *et al.*, 2005). Der Hersteller weist darauf hin, dass eine Porosität von 85 % besonders vorteilhaft sei. ASEFNEJAD *et al.*, die  $\epsilon$ -Polycaprolacton als Basismatrix verwendeten, bestätigten in allen ihren Proben die gute Anheftung und Proliferation (Asefnejad *et al.*, 2011). Frühere Studien zeigen jedoch ein differenzierteres Bild. Denn die Diffusion von Matrix-Molekülen in das Nährmedium führte zu einer geringeren Ausbildung von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix sowie einer Differen-

zierung der Zellen (Grad *et al.*, 2003). Daraufhin untersuchten BOOMER *et al.* insgesamt sechs verschiedene synthetisch hergestellte Materialien. Dabei stellte sich heraus, dass die PCL-basierten Templates zwar nur eine geringe Schrumpfung nach der Transplantation aufwiesen, jedoch ein Zellwachstum erst nach ca. vier Wochen statistisch nachweisbar war (Boomer *et al.*, 2013). Insgesamt ist festzustellen, dass die Biokompatibilität der PCL-basierenden Kunststoffe gut ist, jedoch blieben die Erwartungen bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit hinter der Realität zurück. Da Zellen von älteren Patienten ohnehin ein langsames Wachstum aufweisen bedeutet das, dass der Einsatz dieser Kunststoffe für jene Zellen eher ungeeignet ist.

Dagegen können insbesondere auf Kollagen basierende Trägersubstanzen, wie Matrigel, ein gutes Zellwachstum sowie Ausbildung von Acini-ähnlichen Strukturen gewährleisten (Ozdemir *et al.*, 2017). Der Grund dafür scheint zu sein, dass auf synthetischen Trägersubstanzen befindliche Zellen im Vergleich zu Kollagen die Entstehung der Komponenten wie EZM oder der Basalmembran (BM) behindern, bzw. irreversibel hemmen (Shubin *et al.*, 2015). Gerade die sehr sensiblen Zellen der Glandula Parotis scheinen darauf mit geringerem Wachstum, weniger Migration und einer geringeren Proliferation zu reagieren.

Im Ergebnis der Untersuchungen ließ sich also feststellen, dass die applizierten Zellen keine bzw. nur eine geringe Tendenz zeigten, sich von dem Fibrinogen-Thrombin-Gemisch auf das Polyurethan zuzubewegen, obwohl die durchschnittliche Porengröße des verwendeten Materials 200  $\mu\text{m}$  betrug. OH *et al.* empfahlen eine Porengröße von 186 – 200  $\mu\text{m}$  (Oh *et al.*, 2007). Dass eine Veränderung der Porengröße bei gleichem Ausgangsmaterial zu unterschiedlichen Ergebnissen der Differenzierung führt, zeigten bereits STENHAMRE *et al.* im Jahre 2011 (Stenhamre *et al.*, 2011).

Neben den Matrices aus Hydrogel, Kollagen oder Kunststoffen wie Polyurethan wurde durch BURGHARTZ *et al.* eine weitere Matrix zur Anzucht von epithelialen Zellen der Speicheldrüse verwendet. Die Grundlage stellt dezellularisierter Dünndarm vom Schwein dar (Burghartz *et al.*, 2018). Die hier verwendete Matrix namens SIS-muc (small intestinal submucosa + mucosa) hat den Vorteil, dass für die Besiedlung wichtige Komponenten der EZM und der BM bestehen bleiben (Badylak *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 2013). Die angezüchteten humanen epithelialen Speicheldrüsenzellen zeigten in Kokultur mit mikrovaskulären Endothelzellen bis zum Untersuchungstag 14 eine konfluente einschichtige Besiedelung an der Oberfläche. Der ehemalige Kryptengrund der besiedelten Matrix zeigte ebenfalls einen Zellbewuchs mit Zell-Cluster-Bildung und

stabiler  $\alpha$ -Amylase und AQP5 Expression. Möglicherweise weist gerade die EZM des Kryptengrunds fördernde Bedingungen zum 3D-Wachstum. Interessanterweise weist ursprünglicher Dünndarm in der Kryptentiefe multipotente Stammzellen sowie Myofibroblasten auf (HEATH, 1996).

Im Gegensatz zu der zitierten Arbeit von OH *et al.* war in der vorliegenden Arbeit über einen Untersuchungszeitraum von 21 Tagen weder ein Zellwachstum noch der Nachweis von Aquaporin 5 feststellbar.  $\alpha$ -Amylase wurde nur auf niedrigem Niveau nachgewiesen. Aus diesen Gründen erschien es sinnvoll, die Herstellung der Schnittpräparate nochmals kritisch unter die Lupe zu nehmen.

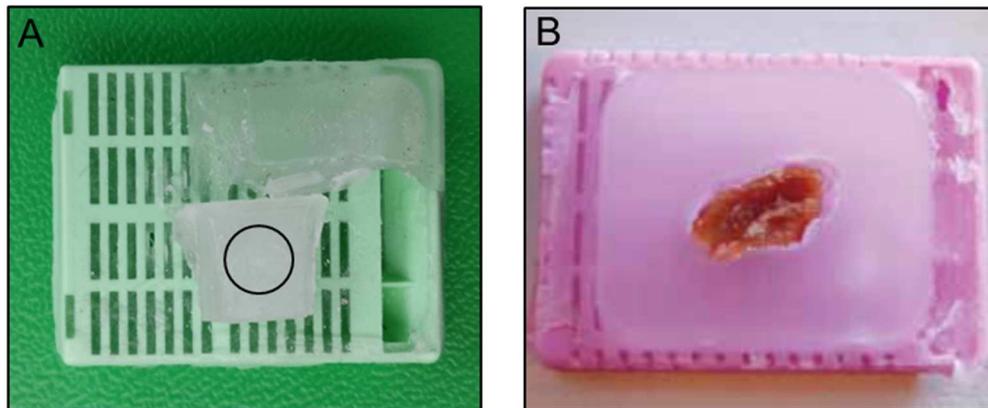
### 4.3.3 Herstellung der Schnittpräparate

Das hier durchgeführte wissenschaftliche Experiment hatte das Ziel, histologische Nachweise auf Grundlage der Paraffineinbettung und der Kryokonservierung zu erbringen – jeweils pro Patienten und für jeweils jeden Untersuchungstag. Dabei zeigte sich, dass das Schneiden der Präparate in Vorbereitung zur histologischen Untersuchung ein nahezu unüberwindliches Problemfeld darstellte. Denn das Schneiden der in Paraffin gegossenen Matrices erwies sich als nicht praktikabel. Anfangs ließ sich der Paraffinblock noch problemlos mit dem Mikrotom zerteilen. Doch bei Erreichen der Probe kam es zu einer girlandenförmigen Separation und zu einem Zerschneiden des Schnittes. Das Schnittergebnis warf die Frage auf, ob in der Präparation der Matrices ein Fehler aufgetreten war. Im Folgenden wird erläutert, welche Punkte dabei einer genaueren Betrachtung unterzogen wurden.

Zuerst wurde überprüft, ob eine fachgerechte Infiltration durch das Paraffin vorlag. Eine mangelhafte Paraffin-Durchdringung tritt häufig auf, insbesondere dann, wenn die Zeitdauer des Protokolls zu kurz angelegt ist. Er äußert sich in einer unzureichenden Fixierung der Probe und in einer Schrumpfung des Gewebes im umgebenden Wachs. Des Weiteren weist das Gewebe eine weiche und schwammige Konsistenz auf, die ein Schneiden unmöglich machte.

Bei den selbst hergestellten Proben (Abbildung 26A) war keine unzureichende Fixierung erkennbar und eine Grenze zwischen Paraffin und der Probe war nicht festzustellen. In der Abbildung 26B, entnommen aus der Broschüre „*Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom*“, Leica Biosystems Nussloch GmbH, lässt sich bereits bei einer visuellen Prüfung des Pankreas-Blocks die fehlerhafte Infiltration feststellen.

Ein weiterer Faktor, der sich negativ auf die Schnittergebnisse ausgewirkt haben könnte, ist die Temperatur des Blocks, weil sich dadurch die Härte des umgebenden Wachses beeinflussen lässt. Es ist bekannt, dass eine zu warme Lagerung zu schlechten Schnittergebnissen führen kann. Auch in diesem Punkt ließ sich im Arbeitsverlauf kein Fehler finden, da die Blöcke jeweils vor dem Schneiden für mehrere Minuten auf einer Kühlplatte gelagert wurden.



**Abbildung 26: Eingebettete Proben im Paraffinblock**

(A) Der Quader-förmige Block enthält das eingeschlossene, mit Paraffin durchdrungene Konstrukt (Kreis). (B) Exemplarisches Bild eines unzureichend fixierten Pankreas-Blocks aus der Broschüre „Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom“ mit freundlicher Genehmigung der Leica Biosystems Nussloch GmbH

Im Anschluss wurde die Fixierung sorgfältig überprüft. Unverzüglich nach Entnahme der betreffenden Schwämmchen wurden diese 3x in PBS gewaschen und direkt in PFA 4% bei -4°C aufbewahrt. Eine weitere Überlegung war, ob nicht das Lösungsmittel Xylol, das bei der Einbettung zur Verdrängung des absoluten Alkohols dient, zu einem negativen Ergebnis hätte führen können. Bei bestimmten histologischen Schnitten konnte beobachtet werden, dass dieser Schritt zu einer Wellung der Schnitte führte. In diesen Fällen wurde das Terpen Rotihistol als Intermedium eingesetzt. Da dies jedoch einen vollkommen neuen Versuchsaufbau benötigt hätte, wurde dieses Vorhaben wieder verworfen.

Zur Vorbereitung der Gefrierschnitte wurde analog zu dem beschriebenen Protokoll vorgegangen. Wie auch in Paraffin ließen sich die Schichten des Blockes, bestehend aus reinem Tissue-Tek, gut schneiden. Bei Erreichen der zu schneidenden Matrices fiel jedoch als Erstes auf, dass dieses aus der Schnittebene herausragt (siehe Abbildung 27). Beginn man danach die Probe zu zerteilen, kam es nach anfänglichen nicht verwertbaren Schnitten auch hier zum Zerschneiden der Präparate. Um die kleinsten Strukturen des Gewebes histologisch so präzise wie möglich untersuchen zu können,

waren aber Schnitte von wenigen Mikrometern Dicke anzufertigen. In der Elektronenmikroskopie werden allgemein Schnitte von einer durchschnittlichen Dicke von 6 - 10  $\mu\text{m}$  untersucht. Dies gewährleistet im Regelfall eine ausgewogene Mischung aus Stabilität und Darstellbarkeit. Die Idee war nun, die Schneiddicke soweit zu erhöhen, dass sich ein kompletter Schnitt durch das Gewebe herstellen lässt. Dem gegenüber standen Bedenken, dass sich bei einer bestimmten Schnittdicke die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Strukturen überlappend dargestellt werden und somit kein genaues Bild entstehen kann.

Mehrere Versuche wurden unternommen, um eine brauchbare Schnittdicke zu finden. Es wurden Schnitte bis zu einer Schnittdicke von 30  $\mu\text{m}$  getestet, jedoch blieb es auch bei dieser für histologische Schnitte extremen Größe bei den beschriebenen negativen Ergebnissen. Es ließ sich jedoch feststellen, dass die Schnitte Areale aufwiesen, in denen kein Tissue Tec vorhanden war. Ob es sich dabei um Räume innerhalb des Schwämmchens handelte, ließ sich nicht eruieren.

Wie bei den Paraffinschnitten, wurde auch die Schneidetemperatur bei den Schnitten im Kryoverfahren auf ihre Exaktheit überprüft. In diesem Fall lag der Fokus nicht auf dem Einbettmedium, sondern vielmehr auf der Probe selbst. Ausgehend von den bisherigen Erfahrungen stellte sich die Frage, ob man nicht durch eine niedrigere Temperatur Einfluss auf die Eigenschaften des Kunststoffes nehmen und dadurch eine Verbesserung der Schnittqualität erreichen könnte. Die niedrigste Temperatur, die über einen längeren Zeitraum im Kryotom aufrechterhalten werden konnte, lag bei etwa  $-26^{\circ}\text{C}$ . Zur Bearbeitung der Proben musste der Schneiderraum regelmäßig geöffnet werden. Somit konnte die notwendige niedrige Arbeitstemperatur nicht über den kompletten Zeitraum aufrechterhalten werden.

Auch wurden unterschiedliche Einbettmethoden getestet, die jedoch alle letztendlich zu den gleichen Ergebnissen führten. Aufgrund der Erfahrung, die aus der Einbettung in Paraffin gewonnen werden konnte, kann man schlussfolgern, dass zwar die Einbettmedien in die obersten Schichten einsickern, jedoch nicht ins Innere vordringen. Klar



**Abbildung 27: Eingefrorene besiedelte Matrix**

Mittels Tissue Tec auf dem Schnittblock fixiertes PUR. Mit einem Kreis markiert ist das Kunststoffschwämmchen, das aus der Schnittfläche herausragt.

wurde damit, dass im Vergleich zu reinen Gewebeschnitten sich das Polyurethan erheblich schlechter zerteilen lässt. Auch bei guten Schnitten besteht ein qualitativer Unterschied.

Eine Erklärung könnte sein, dass die Einbettmedien nicht tief genug in die Schwämmchen infiltrieren und so der Auffüllungsgrad, der für das Schneiden notwendig ist, nicht ausreichend hoch ist. Eine andere Erklärung könnte sein, dass bei anderen Zellen, wie beispielsweise den Chondrozyten, nach Anzüchtung eine festere und durchgehendere Matrix mit einer besseren strukturellen Integrität entsteht. Dies schien bei Parotiszellen in dieser Form offensichtlich nicht gegeben zu sein.

#### **4.3.4 Gesamtschau**

Polarität ist eine grundlegende Eigenschaft, die dafür sorgt, dass die Amylase durch Exozytose die apikale Plasmamembran verlassen und somit in den Speichel abgegeben werden kann. Das untersuchte Aquaporin 5, das an der apikalen Membran vorzufinden war, stellt einen essenziellen Bestandteil beim Aufbau einer Speicheldrüse dar. Auch spielen Veränderungen sowohl bei der Konzentration des Speichels als auch bei der Anpassung der Speichelflussrate eine wichtige Rolle.

Polarität entsteht bekanntlich unter anderem durch das Wechselspiel unterschiedlicher Zelltypen, wie den Myoepithelzellen, Parenchymzellen und auch den Epithelzellen der Glandula Parotis. Dieses Zusammenwirken besteht in alle drei Raumrichtungen. Deshalb ist zu schlussfolgern, dass für die Züchtung einer langlebigen und funktionsfähigen Speicheldrüse offenbar mehrere Modifikationen des Versuchsaufbaus erforderlich sind. Diese betreffen sowohl die zu züchtenden Zellen als auch das Trägermaterial.

Die Trägersubstanz sollte als wesentliche Funktion Zellen ein 3D-Wachstum ermöglichen. Erst dadurch sind die Zellen in der Lage, Acini-ähnliche Strukturen auszubilden. Die Formationen müssen die Möglichkeit haben, sich so an den Träger anzulagern, dass unter anderem ein Lumen zwischen den Zellen entsteht. Nach den Ergebnissen der bekannten Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet erweisen sich hier zwei unterschiedliche Arten von Trägersubstanzen im Hinblick auf die Züchtung von Speicheldrüsenzellen als vielversprechend. Bei der einen handelt es sich um ein künstlich erzeugtes Material, dem sogenannten Hydrogel. Mit ihm konnte bereits eine stabile Vitalität der Zellen über 42 Tage erreicht werden. Die Zellen zeigten eine gute Funktionalität und ein gutes Ansprechen auf eine mögliche physiologische Änderung der Speichelflussrate (Pradhan-Bhatt *et al.*, 2014). Auch besteht hier die Möglichkeit, physikalische oder

chemische Gradienten einzuarbeiten. Dies könnte zu einem gerichteten Wachstum und somit zu einer schnelleren Aneinanderlagerung und Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Bei der anderen Art von Trägersubstanz könnte sich die Technik der Dezellularisierung von bestehenden Geweben als vielversprechend darstellen. Arbeitsgruppen um YAGI oder ARENAS-HERRERAS, die diese Technik bei Herz-, Leber- und Lungenzellen anwandten, waren in der Lage, damit gute Ergebnisse zu erzielen (Arenas-Herrera *et al.*, 2013; Yagi *et al.*, 2013).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei Tumoren von Kopf und Hals kann primär oder adjuvant durch Bestrahlung therapiert werden. Die Folgen dieser Behandlung können Xerostomie, Karies, Infektionen, Dysphagie oder Mundgeruch sein. Diese Nebenwirkungen vermindern die Lebensqualität des Patienten. Unterschiedliche Behandlungsansätze haben aufgrund von therapiebedingten Einschränkungen nicht den Weg in den klinischen Alltag gefunden. Eine Alternative zu den vorhandenen Behandlungsansätzen kann das Tissue Engineering sein. Das Ziel einer Normalisierung der Speichelproduktion nach Behandlung soll durch eine implantierbare, künstliche Speicheldrüse erreicht werden. Kann humanes natives Speicheldrüsengewebe der Parotis auf gradientenfreiem dreidimensional aufgebauten Polyurethan wachsen und seine Funktionalität beibehalten?

Humane Parotiszellen wurden von 20 Patienten im Alter von 42 - 90 Jahren durch Operation entnommen und in Polystyrol-Zellkulturflaschen mit dem Nährmedium BEGM herangezüchtet. Es erfolgte eine 2D-Zellverteilung der reinen Parotiskultur. Zur Kontrolle der Vitalität zwischen den Passagen wurde eine Trypan-Blau Färbung verwendet. Als Trägermaterial der Zellen wurde eine biokompatible, abbaubare Matrix aus  $\epsilon$ -Polycaprolacton verarbeitet. Die Übertragung der humanen Parotiszellen wurde mit einer Kleberproteinlösung, bestehend aus den Hauptbestandteilen Aprotinin, Fibrinogen und der Thrombinlösung durchgeführt. 7, 14 und 21 Tage nach Aufbringung wurde der Überstand der zeitgleich entnommenen Konstrukte zur Überprüfung des  $\alpha$ -Amylase konserviert. Zusätzlich wurden an den 3 Untersuchungstagen Konstrukte für die Anfertigung von histologischen Schnitten, quantitativer PCR, indirekter Immunfluoreszenz und zur Elektronenmikroskopie entnommen. Zur Überprüfung der Funktionalität der angezüchteten Speicheldrüsenzellen wurde das Enzym  $\alpha$ -Amylase und das Wasserkanalprotein Aquaporin 5 herangezogen.

Bei der Kultivierung der humanen Speicheldrüsenzellen konnte durch den Vitalitätstest Trypan-Blau Färbung in Kombination mit einer Neubauerzählkammer eine konstant hohe Anzahl an vitalen Zellen bis zur 4. Passage nachgewiesen werden. Durch die Lebend/Tot Färbung auf FDA/EB Basis der Konstrukte über die Untersuchungszeit von 14 Tagen konnte keine Vermehrung von avitalen Zellen mikroskopisch festgestellt werden. Die statistische Auswertung mittels Boxplots des ELISA berechnete für den ersten

Untersuchungstag einen Median auf niedrigem Niveau von 4,4 U/l und sank im weiteren Zeitverlauf am Untersuchungstag 21 auf die niedrigsten Median von 2,2 U/l ab.  $\alpha$ -Amylase konnte an allen 3 Tagen mittels quantitativer PCR und indirekter Immunfluoreszenz belegt werden. Aquaporin 5 als Funktionsnachweis war in der vorliegenden Studie nicht signifikant durch quantitative PCR beweisbar. Die Rasterelektronenmikroskopie bildete adhärente Zellen in kugeliger Form aus den besiedelten Matrices nach 7 Tagen Kultivierung ab. Durch die Transmissionselektronenmikroskopie konnten Zellen, die Zellfortsätze ausgebildet hatten nach 14 Tagen beobachtet werden. Der Versuch, histologische Schnitte auf Grundlage der Paraffineinbettung oder Kryo-Konservierung zu erzeugen, musste frustriert abgeschlossen werden.

Eine Kultivierung von Speicheldrüsenzellen auf einer Matrix aus  $\epsilon$ -Polycaprolacton ohne Gradienten ist eingeschränkt umsetzbar. Die Studie konnte zeigen, dass das Wachstum der Zellen auf konstant niedrigem Niveau über den Untersuchungszeitraum von 21 Tagen lag. Der Funktionsnachweis von  $\alpha$ -Amylase auf absinkendem niedrigem Niveau sowie fehlender Bestätigung von Aquaporin 5 kann als stationäre Phase des Wachstums interpretiert werden. Zur Verbesserung der Zellentwicklung sollte die besiedelte Matrix zu einem 3D-Zellwachstum anregen. Bei sequenziell entstehender Polarität der Zellen käme es zu einer Verbesserung der Vitalität sowie der vermehrten Ausbildung von  $\alpha$ -Amylase und Aquaporin 5. Dies könnte in einer Kombination der Zellkultur aus Parotiszellen mit Kokulturen aus humanen Myoepithelzellen und Parenchymzellen erreicht werden. Sehr gute Ergebnisse des Zellwachstums und der Zellfunktion konnten aktuell in anderen Studien auf der Trägersubstanz Matrigel oder durch Rebesiedelung von dezellularisierten Organen beobachtet werden.

## 6 ANHANG

### 6.1 Tabellen der Messergebnisse

#### ELISA Ergebnisse

Tabelle 7:  $\alpha$ -Amylase-Enzymaktivitätswerte in U/l der 20 Patienten (Pat.) der Untersuchungstage (UT) 7-21

Patient	UT7	UT14	UT21
1	3,5	0,9	0,2
2	7,3	6,6	5,3
3	2,2	1,3	0,5
4	3,4	2,2	0,3
5	6,4	5,6	3,2
6	1,7	1,5	1,6
7	3,5	2,1	1,9
8	3,7	2,6	1,7
9	6,4	3,8	3,6
10	5,7	2,3	1,8
11	4,0	1,4	1,7
12	5,2	3,9	3,2
13	4,7	3,1	1,9
14	4,1	2,8	1,9
15	4,1	2,9	2,5
16	5,9	4,0	2,8
17	6,3	4,5	4,2
18	3,9	3,3	2,6
19	5,3	3,5	3,3
20	5,5	4,9	2,8

Tabelle 8:  $C_T$ -Werte des nativen humanen Parotiszewebes der Patienten A und B in Duplikaten (D) 1 und 2

Patient	D	Amylase	Aquaporin 5	Cytokeratin	GAPDH
A	1	28,28	42,43	21,39	25,31
	2	28,18	41,89	20,21	25,21
B	1	19,12	35,57	19,04	24,47
	2	18,74	32,92	18,94	24,17

Tabelle 9:  $C_T$ -Werte der *in vitro* kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Untersuchungstage (UT) 7-21 in Duplikaten (D) für Cytokeratin 7

Patient	UT	D	GAPDH	EF1a	Cytokeratin 7
1	7	1	20,98	20,26	23,22
		2	19,56	18,91	22,81
	14	1	22,37	20,26	27,51
		2	22,30	19,84	22,81

	21	1	25,46	20,25	24,91
		2	23,67	19,84	24,60
2	7	1	21,30	18,90	25,03
		2	17,71	18,50	23,17
	14	1	23,37	21,22	25,21
		2	22,33	20,81	25,53
	21	1	26,98	19,99	24,66
		2	25,54	19,59	24,58
3	7	1	25,30	19,33	25,05
		2	22,45	19,00	25,03
	14	1	23,52	19,27	26,53
		2	23,06	19,14	26,12
	21	1	27,89	19,61	25,40
		2	23,53	19,15	23,82

Tabelle 10: Ct-Werte der *in vitro* kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Untersuchungstage 7-21 in Duplikaten (D) 1 und 2 für  $\alpha$ -Amylase

Patient	UT	D	GAPDH	EF1a	$\alpha$ -Amylase
1	7	1	22,98	18,19	26,29
		2	22,67	17,66	26,06
	14	1	23,50	19,33	31,79
		2	23,33	19,05	31,76
	21	1	27,06	18,74	37,92
		2	26,67	18,63	35,53
2	7	1	23,35	18,66	26,75
		2	23,11	18,50	26,66
	14	1	25,44	18,53	28,36
		2	24,74	18,33	27,73
	21	1	24,99	19,86	31,03
		2	24,95	19,48	30,97
3	7	1	19,52	18,03	27,69
		2	17,96	17,88	27,15
	14	1	23,33	18,29	35,41
		2	22,90	17,38	33,36
	21	1	23,78	18,17	28,26
		2	23,24	18,07	27,36

Tabelle 11: Ct-Werte der *in vitro* kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Untersuchungstage 7-21 in Duplikaten (D) 1 und 2 für Aquaporin 5

Patient	UT	D	GAPDH	EF1a	Aquaporin 5
1	7	1	18,58	19,06	41,87
		2	18,16	18,76	30,67
	14	1	22,09	19,23	43,22
		2	20,71	19,02	38,93
	21	1	19,76	18,93	40,46
		2	19,69	18,77	32,86
2	7	1	19,78	18,56	37,03
		2	19,59	18,36	35,65

	14	1	33,41	19,93	39,85
		2	33,33	18,58	39,48
	21	1	21,82	20,24	40,30
		2	20,77	18,58	34,92
3	7	1	20,31	19,23	41,93
		2	18,57	18,42	34,93
	14	1	24,91	19,37	38,40
		2	21,48	19,09	35,61
	21	1	18,23	19,65	41,86
		2	17,72	19,54	39,18

## 6.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Tabelle 12: Geräte

Geräte	Firma, Ort
Accu-jet® pro, Pipettierhilfe	Accu-jet®, Brand GmbH, Wertheim, (D)
Autoklav, Dampfsterilisation	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, (D)
CO <sub>2</sub> Incubator BBD 6220	Heraeus, Hanau, (D)
CP 4056 Kühl-Gefrier-Kombination	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Würzburg, (D)
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Eppendorf Mini Spin Column, Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Feinwaage	Kern, Albstadt, (D)
Fluoreszenzmikroskop DMI 4000 B	Leica, Wetzlar, (D)
Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop JSM 7500F	Jeol GmbH, Freising, (D)
Gelelektrophoresekammer	PeqLab Biotechnology, Erlangen, (D)
Gelschlitten	PeqLab Biotechnology, Erlangen, (D)
Heizplatte, M6	CAT / M. Zipperer GmbH, Staufen, (D)
HERAsafe, sterile Werkbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, (D)
Kryotom, CM1510 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, (D)
Membran-Vakuumpumpe	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz, (D)

Geräte	Firma, Ort
Durchlichtmikroskop, 473028	ZEISS, Oberkochen, (D)
Mikrowelle Privileg 8020	Quelle, Fürth, (D)
Rotationsmikrotom RM 2255	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Sagnac-Interferometer Spectra Cube SD-200	Applied Spectral Imaging (ASI), MigdalHaemek, IL)
Schüttelinkubator, Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Schüttelinkubator, TH 25	Edmund Bühler GmbH, Tübingen, (D)
Step-One™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
Stickstofftank	Air liquide-DMC, Marne-la-Vallée, (F)
Titertek Multiskan® Plus Microplate Reader	Lab systems, Helsinki, (FIN)
Transmissionselektronenmikroskop JEM 2100	Jeol GmbH, Freising, (D)
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, (CH)
Wasserbad, Julabo U37A	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, (D)

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
chirurgische sterile Einmal-Skalpelle	FEATHER Safety Razor CO., LTD., Osaka, (J)
Cryomolds®, Tissue Tek® (10 mmx10 mmx10 mm)	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, (NL)
Biopsiestanze, Ø 4 mm, 5 mm	Harris Uni-Core™, Redding, CA, USA
Deckgläser (24x50 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, (D)
Einfrierer Cryo Tube 2 ml	Nalgene® Labware, Roskilde, (DK)
Eppendorf UVette®	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, (D)
Micro Amp 8 Cap strips	Applied Biosystems®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
Micro Amp Fastoptical 96-Well Plate	Applied Biosystems®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
Mr. Frosty, Einfrierbehälter	Nalgene® Labware, Roskilde, (DK)
Pasteurpipetten, 230 mm	Brand GmbH, Wertheim, (D)
200µl, 1000µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht, (D)
0,5-10µl Pipettenspitzen	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, (D)
Objekträger, Super Frost® Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, (D)
Rollrandgefäß	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, (D)
RNAlater	Ambion, Austin, Texas, (USA)
Sigma-Parafilm®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
QIA RNeasy spin column	Qiagen GmbH, Hilden, (D)
QIA shredder spin column	Qiagen GmbH, Hilden, (D)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürmbrecht, (D)
steriler Filter, Filtropuor 0,45 µm	Sarstedt, Nürmbrecht, (D)
Zellkulturflaschen, 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, (D)
Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, (D)
Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, (D)
Zellsieb 100 µm	Biosciences, Bedford, MA, (USA)

Tabelle 14: Chemikalien

Chemikalien	Firma, Ort
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Agarosepulver LE	Biozym Scientific, Oldendorf, (D)
Aluminiumsulfat	Merck, Darmstadt, (D)
Alzianblau Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Aprotinin	Baxter D GmbH, Unterschleissheim, (D)

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma, Ort</b>
Blyscan Sulfated Glycosaminglycan Assay	Bicolor, Carrickfergus, Großbritannien (GB)
Buffer RLT, Lyse Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, (D)
Buffer RW1, Wasch Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, (D)
Buffer PPE, Wasch Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, (D)
Cell-Wash	BD, Biosciences, Franklin Lakes, NJ, (USA)
RNase-freies Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
4',6-Diamidin-2-phenylindol	Fluoromount-GTM, SouthernBiotech, Birmingham, AL, (USA)
3,3' Diaminobenzidine (DAB) enhanced liquid system	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Eisessig, 100 %	Mallinckrodtbaker B.V., Deventer, (NL)
Entellan	Merck, Darmstadt, (D)
Eosin	Merck, Darmstadt, (D)
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim, (D)
Ethidiumbromid	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, (D)
Fibrinogen, from bovine plasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Glucose	Merck, Darmstadt, (D)
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, (D)
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, (D)
O.C.T™ Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, (NL)
Paraformaldehyd	AppliChem GmbH, Darmstadt, (D)
PBS, 10x	Roche Diagnostics, Mannheim, (D)

Chemikalien	Firma, Ort
Rnalater®	Ambion, Austin, TX, (USA)
Streptavidin Peroxidase Polymer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
SuperScript R Vilo™ Mastermix	Invitrogen®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
Taq Man Gene Expression Master Mix	Invitrogen®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
Thrombin S	Baxter D GmbH, Unterschleissheim, (D)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt, (D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Trypsin 0,25%-EDTA 1x	Gibco®, life technologies, Darmstadt, (D)

Tabelle 15: Nährmedium und Zusätze

Nährmedium und Zusätze	Firma, Ort
β-Glycerol 2-phosphat disodium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Bronchial Epithel Growth -Medium	Promo Cell, GmbH Heidelberg, (D)
BMP-6 human recombinant	Promo Cell GmbH, Heidelberg, (D)
Dexamethasone	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium 1	Gibco®, life technologies™ GmbH, Darmstadt, (D)
FCS (Fötale Kälberserum)	Linaris, Wertheim-Bettingen, (D)
L-Ascorbic acid-2-phosphate salt hydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
L-Proline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Penicillin-Streptomycin, (1000 U/1000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, (D)
Sodium Pyruvate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)

Tabelle 16: Antikörper

Antikörper	Firma, Ort
$\alpha$ -Amylase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Aquaporin 5 (Aqp5)	Epitomics Inc, CA (USA)
Biotin Anti-Rabbit IgG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)
Cytokeratin 7 (CK7)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, (D)

### 6.3 Copyright und Lizenzen

<b>Abbildung 1: Bild einer Mundhöhle mit Xerostomie</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	2
<b>Abbildung 2: Darstellung des Gentransfers durch adenovirale Übertragung</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	5
<b>Abbildung 3: Schematische Darstellung diverser Adenovirus-Varianten</b>	
Copyright bei Publizist Gene Therapy durch RightsLink, Copyright Clearance Center eingeholt. Aktuell durch RightsLink Nutzung unter der Nummer 4862900456088 in einer Dissertation eingeholt/vorliegend .....	6
<b>Abbildung 4: Bild eines sterilen <math>\epsilon</math>-Caprolacton - Polyurethan-Schwämmchens mit beiliegendem Maßstab (<math>\varnothing</math> 5 mm; Höhe 2 mm)</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	12
<b>Abbildung 5: Schematische Zeichnung einer Zellmigration: Sagittale und axiale Ansicht einer Zelle</b>	
Copyright bei Publizist Developmental Biology durch RightsLink, Copyright Clearance Center eingeholt. Aktuell durch RightsLink Nutzung unter der Nummer 4863140012901 in einer Dissertation eingeholt/vorliegend.....	13
<b>Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	19
<b>Abbildung 7: Typisches Bild einer Vitalfärbung</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	20
<b>Abbildung 8: Overlay der FDA/EB-Vitalfärbung</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	21
<b>Abbildung 9: Herstellung der Polyurethan-Matrix</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	21
<b>Abbildung 10: Polyurethan-Matrix in 2,5- facher Vergrößerung</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	22
<b>Abbildung 11: Sandwich-ELISA Test</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	26
<b>Abbildung 12: Mechanismus der Taq-Man PCR</b>	
This work has been released into the public domain by its author, Braindamaged at English Wikipedia. This applies worldwide. In some countries this may not be legally possible; if so: Braindamaged grants anyone the right to use this work for any	

	purpose, without any conditions, unless such conditions are required by law. Englische Beschreibung des angelehnten, originären Bildes: TaqMan® probe chemistry mechanism; May 2009; Author: User: Braindamaged.....	35
<b>Abbildung 13:</b>	<b>Beispiel einer Gelelektrophorese</b> Copyright bei Publizist eingeholt. Schriftliche Bestätigung durch Michael Hönscheid; Presse- und Öffentlichkeitsarbeit Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) .....	39
<b>Abbildung 14:</b>	<b>Lebend/Tot Färbung</b> Abbildung selbst erstellt.....	44
<b>Abbildung 15:</b>	<b>Boxplot-Diagramm der gemessenen <math>\alpha</math>-Amylase-Konzentration mittels ELISA</b> Abbildung selbst erstellt.....	45
<b>Abbildung 16:</b>	<b>Immunhistochemische Färbung gegen <math>\alpha</math>-Amylase (Alexa Fluor 488)</b> Abbildung selbst erstellt.....	46
<b>Abbildung 17:</b>	<b>Immunhistochemische Färbung gegen Pan-Cytokeratin (Alexa Fluor 488)</b> Abbildung selbst erstellt.....	47
<b>Abbildung 18:</b>	<b>Besiedeltes Konstrukt in Rasterelektronenmikroskopdarstellung</b> Behandlung, Betrachtung und Fotodokumentation der selbst erstellten Proben durch die Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften AG Prof. Dr. G. Krohne .....	48
<b>Abbildung 19:</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen</b> Behandlung, Betrachtung und Fotodokumentation der selbst erstellten Proben durch die Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften AG Prof. Dr. G. Krohne .....	49
<b>Abbildung 20:</b>	<b>Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Cytokeratin 7</b> Abbildung selbst erstellt.....	50
<b>Abbildung 21:</b>	<b>Graphische Darstellung der relativen Genexpression von <math>\alpha</math>- Amylase</b> Abbildung selbst erstellt.....	51
<b>Abbildung 22:</b>	<b>Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Aquaporin 5</b> Abbildung selbst erstellt.....	51

<b>Abbildung 23: Gelelektrophorese von 6 Proben zum Nachweis spezifischer Gene für GAPDH, <math>\alpha</math>-Amylase und Aquaporin 5</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	52
<b>Abbildung 24: REM-Übersichtsbild des besiedelten Konstruktes</b>	
Behandlung, Betrachtung und Fotodokumentation der selbst erstellten Proben durch die Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften AG Prof. Dr. G. Krohne .....	58
<b>Abbildung 25: Graphische Darstellung der Auftragung der Zellen auf einer Matrix aus Hyaluronsäure-Hydrogel</b>	
Copyright bei Publizist eingeholt. Schriftliche Bestätigung durch Karen Ballen, Manager Reprint Dept. bei Publisher: Mary Ann Liebert, Inc.....	58
<b>Abbildung 26: Eingebettete Proben im Paraffinblock</b>	
Abbildung A selbst erstellt; Abbildung B aus der Broschüre „Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom“ mit freundlicher Genehmigung der Leica Biosystems Nussloch GmbH. Copyright bei genannter Firma eingeholt. Schriftliche Bestätigung durch Clay Little (Senior Director Strategic Marketing) and Veronique Berger (VP Global Marketing) .....	66
<b>Abbildung 27: Eingefrorene besiedelte Matrix</b>	
Abbildung selbst erstellt.....	67

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, F., Wyckoff, J., Lin, E. Y., Wang, W., Wang, Y., Hennighausen, L., Miyazaki, J., Jones, J., Pollard, J. W., Condeelis, J. S. und Segall, J. E. (2002). **GFP expression in the mammary gland for imaging of mammary tumor cells in transgenic mice**. *Cancer Res* 62, S. 7166-7169, pmcid: 12499251.
- Alevizos, I., Zheng, C., Cotrim, A. P., Goldsmith, C. M., McCullagh, L., Berkowitz, T., Strobl, S. L., Malyguine, A., Kopp, W. C., Chiorini, J. A., Nikolov, N. P., Neely, M., Illei, G. G. und Baum, B. J. (2017). **Immune reactivity after adenoviral-mediated aquaporin-1 cDNA transfer to human parotid glands**. *Oral Dis* 23, S. 337-346, doi: 10.1111/odi.12614.
- Anaya-Saavedra, G., Ramirez-Amador, V., Irigoyen-Camacho, M. E., Garcia-Cuellar, C. M., Guido-Jimenez, M., Mendez-Martinez, R. und Garcia-Carranca, A. (2008). **High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study**. *Arch Med Res* 39, S. 189-197, doi: 10.1016/j.arcmed.2007.08.003.
- Arenas-Herrera, J. E., Ko, I. K., Atala, A. und Yoo, J. J. (2013). **Decellularization for whole organ bioengineering**. *Biomed Mater* 8, URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-6041/8/1/014106> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1088/1748-6041/8/1/014106.
- Asefnejad, A., Khorasani, M. T., Behnamghader, A., Farsadzadeh, B. und Bonakdar, S. (2011). **Manufacturing of biodegradable polyurethane scaffolds based on polycaprolactone using a phase separation method: physical properties and in vitro assay**. *Int J Nanomedicine* 6, S. 2375-2384, doi: 10.2147/ijn.s15586.
- Assy, Z. und Brand, H. S. (2018). **A systematic review of the effects of acupuncture on xerostomia and hyposalivation**. *BMC Complement Altern Med* 18, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5811978> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1186/s12906-018-2124-x.
- Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M., Kadler, K. und Shuttleworth, C. A. (1998). **The Extracellular Matrix Factsbook**, 2. Aufl., Academic Press, London.
- Ayad, S., Chambers, C. A., Berry, L., Shuttleworth, C. A. und Grant, M. E. (1986). **Type VI collagen and glycoprotein MFPI are distinct components of the extracellular matrix**. *Biochem J* 236, S. 299-302, doi: 10.1042/bj2360299.
- Badylak, S. F., Record, R., Lindberg, K., Hodde, J. und Park, K. (1998). **Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth**. *J Biomater Sci Polym Ed* 9, S. 863-878, doi: 10.1163/156856298x00208.
- Bates, R. C., Edwards, N. S. und Yates, J. D. (2000). **Spheroids and cell survival**. *Crit Rev Oncol Hematol* 36, S. 61-74, doi: 10.1016/s1040-8428(00)00077-9.

- Benton, G., Kleinman, H. K., George, J. und Arnaoutova, I. (2011). **Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells**. *International Journal of Cancer* 128, S. 1751-1757, doi: 10.1002/ijc.25781.
- Bhat, R. R., Chaney, B. N., Rowley, J., Liebmann-Vinson, A. und Genzer, J. (2005). **Tailoring Cell Adhesion Using Surface-Grafted Polymer Gradient Assemblies**. *Advanced Materials* 17, S. 2802-2807, doi: 10.1002/adma.200500858.
- Blom, M., Dawidson, I. und Angmar-Mansson, B. (1992). **The effect of acupuncture on salivary flow rates in patients with xerostomia**. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73, S. 293-298, doi: 10.1016/0030-4220(92)90124-9.
- Boomer, L., Liu, Y., Mahler, N., Johnson, J., Zak, K., Nelson, T., Lannutti, J. und Besner, G. E. (2013). **Scaffolding for challenging environments: Materials selection for tissue engineered intestine**. *J Biomed Mater Res A* 102, S. 3795-3802, doi: 10.1002/jbm.a.35047.
- Borkenhagen, M., Clemence, J. F., Sigrist, H. und Aebischer, P. (1998). **Three-dimensional extracellular matrix engineering in the nervous system**. *J Biomed Mater Res* 40, S. 392-400, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19980603)40:3<392::aid-jbm8>3.0.co;2-c.
- Boucher, R. C., Yankaskas, J. R., Cotton, C. U., Knowles, M. R. und Stutts, M. J. (1987). **Cell culture approaches to the investigation of human airway ion transport**. *Eur J Respir Dis Suppl* 153, S. 59-67, pmcid: 3480822.
- Bradley, M., Cullum, N., Nelson, E. A., Petticrew, M., Sheldon, T. und Torgerson, D. (1999). **Systematic reviews of wound care management: (2). Dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds**. *Health Technol Assess* 3, S. 1-35, pmcid: 10683589.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. und Jemal, A. (2018). **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, S. 394-424, doi: 10.3322/caac.21492.
- Buchanan, J. A., Yeger, H., Tabcharani, J. A., Jensen, T. J., Auerbach, W., Hanrahan, J. W., Riodan, J. R. und Buchwald, M. (1990). **Transformed sweat gland and nasal epithelial cell lines from control and cystic fibrosis individuals**. *J Cell Sci* 95, S. 109-123, pmcid: 1693627.
- Burghartz, M., Lennartz, S., Schweinlin, M., Hagen, R., Kleinsasser, N., Hackenberg, S., Steussloff, G., Scherzad, A., Radeloff, K., Ginzkey, C., Walles, H. und Metzger, M. (2018). **Development of Human Salivary Gland-Like Tissue In Vitro**. *Tissue Eng Part A* 24, S. 301-309, doi: 10.1089/ten.tea.2016.0466.
- Cara, D. C., Kaur, J., Forster, M., McCafferty, D. M. und Kubes, P. (2001). **Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration**

- and chemotaxis in vivo.** *J Immunol* 167, S. 6552-6558, doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6552.
- Chen, G., Shi, X., Sun, C., Li, M., Zhou, Q., Zhang, C., Huang, J., Qiu, Y., Wen, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Yang, S., Lu, L., Zhang, J., Yuan, Q., Lu, J., Xu, G., Xue, Y., Jin, Z., Jiang, C., Ying, M. und Liu, X. (2013). **VEGF-mediated proliferation of human adipose tissue-derived stem cells.** *PLoS One* 8, URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0073673> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1371/journal.pone.0073673.
- Cotrim, A. P., Sowers, A., Mitchell, J. B. und Baum, B. J. (2007). **Prevention of irradiation-induced salivary hypofunction by microvessel protection in mouse salivary glands.** *Mol Ther* 15, S. 2101-2106, doi: 10.1038/sj.mt.6300296.
- Danthinne, X. und Imperiale, M. J. (2000). **Production of first generation adenovirus vectors: a review.** *Gene Therapy* 7, S. 1707-1714, doi: 10.1038/sj.gt.3301301.
- Dardick, I., Dardick, A. M., MacKay, A. J., Pastolero, G. C., Gullane, P. J. und Burford-Mason, A. P. (1993). **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* 76, S. 307-318, doi: 10.1016/0030-4220(93)90259-7.
- Delporte, C., O'Connell, B. C., He, X., Lancaster, H. E., O'Connell, A. C., Agre, P. und Baum, B. J. (1997). **Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, S. 3268-3273, doi: 10.1073/pnas.94.7.3268.
- Dodla, M. C. und Bellamkonda, R. V. (2006). **Anisotropic scaffolds facilitate enhanced neurite extension in vitro.** *J Biomed Mater Res A* 78, S. 213-221, doi: 10.1002/jbm.a.30747.
- Edwards, K. W., Logan, J. und Saunders, N. (2004). **Real-time PCR: An essential guide,** Taylor & Francis, London.
- Eyrich, D., Wiese, H., Maier, G., Skodacek, D., Appel, B., Sarhan, H., Tessmar, J., Staudenmaier, R., Wenzel, M. M., Goepferich, A. und Blunk, T. (2007). **In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds.** *Tissue Eng* 13, S. 2207-2218, doi: 10.1089/ten.2006.0358.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O. und Bray, F. (2018). **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018.** *Eur J Cancer*, S. 356-387, doi: 10.1016/j.ejca.2018.07.005.

- Ferrari, G. und Mavilio, F. (2002). **Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy?** *Neuromuscul Disord* 12, S. 7-10, doi: 10.1016/S0960-8966(02)00102-5.
- Fisher, J., Scott, C., Scarantino, C. W., Leveque, F. G., White, R. L., Rotman, M., Hodson, D. I., Meredith, R. F., Foote, R., Bachman, D. G. und Lee, N. (2003). **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* 56, S. 832-836, doi: 10.1016/s0360-3016(03)00121-4.
- Gillison, M. L. (2008). **Human papillomavirus-related diseases: oropharynx cancers and potential implications for adolescent HPV vaccination.** *J Adolesc Health* 43, S. 52-60, doi: 10.1016/j.jadohealth.2008.07.002.
- Godbey, W. T. und Atala, A. (2002). **In vitro systems for tissue engineering.** *Ann N Y Acad Sci* 961, S. 10-26, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb03041.x.
- Grad, S., Kupcsik, L., Gorna, K., Gogolewski, S. und Alini, M. (2003). **The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations.** *Biomaterials* 24, S. 5163-5171, doi: 10.1016/s0142-9612(03)00462-9.
- Gresz, V., Kwon, T. H., Hurley, P. T., Varga, G., Zelles, T., Nielsen, S., Case, R. M. und Steward, M. C. (2001). **Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, S. G247-254, doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.1.G247.
- Griffith, L. G. und Naughton, G. (2002). **Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities.** *Science* 295, S. 1009-1014, doi: 10.1126/science.1069210.
- Gu, J., Zhu, S., Li, X., Wu, H., Li, Y. und Hua, F. (2014). **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* 9, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788761> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1371/journal.pone.0095968.
- Guan, J., Fujimoto, K. L., Sacks, M. S. und Wagner, W. R. (2005). **Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications.** *Biomaterials* 26, S. 3961-3971, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.018.
- Hagen, R., Scheich, M., Kleinsasser, N. und Burghartz, M. (2016). **Two-stage autotransplantation of human submandibular gland: a novel approach to treat postradiogenic xerostomia.** *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273, S. 2217-2222, doi: 10.1007/s00405-015-3752-0.
- Hanks, C. T. und Chaudhry, A. P. (1971). **Regeneration of rat submandibular gland following partial extirpation. A light and electron microscopic study.** *Am J Anat* 130, S. 195-207, doi: 10.1002/aja.1001300206.

- HEATH, J. P. (1996). **EPITHELIAL CELL MIGRATION IN THE INTESTINE**. *Cell Biology International* 20, S. 139-146, doi: 10.1006/cbir.1996.0018.
- Hiraki, A., Shirasuna, K., Ikari, T., Shinohara, M. und Garrod, D. R. (2002). **Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells**. *J Cell Physiol* 193, S. 55-63, doi: 10.1002/jcp.10149.
- Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Funk, G. F., Robinson, R. A. und Menck, H. R. (1998). **The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck**. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124, S. 951-962, doi: 10.1001/archotol.124.9.951.
- Hofmann, S., Hagenmuller, H., Koch, A. M., Muller, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. L., Merkle, H. P. und Meinel, L. (2007). **Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds**. *Biomaterials* 28, S. 1152-1162, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.019.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. und Zumla, A. (2005). **Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations**. *Genes Immun* 6, S. 279-284, doi: 10.1038/sj.gene.6364190.
- Hughes, C. S., Postovit, L. M. und Lajoie, G. A. (2010). **Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture**. *Proteomics* 10, S. 1886-1890, doi: 10.1002/pmic.200900758.
- Janebodin, K., Buranaphatthana, W., Ieronimakis, N., Hays, A. L. und Reyes, M. (2013). **An in vitro culture system for long-term expansion of epithelial and mesenchymal salivary gland cells: role of TGF-beta1 in salivary gland epithelial and mesenchymal differentiation**. *Biomed Res Int* 2013, 815895, URL: <https://doi.org/10.1155/2013/815895> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1155/2013/815895.
- Jensen, S. B., Pedersen, A. M., Vissink, A., Andersen, E., Brown, C. G., Davies, A. N., Dutilh, J., Fulton, J. S., Jankovic, L., Lopes, N. N., Mello, A. L., Muniz, L. V., Murdoch-Kinch, C. A., Nair, R. G., Napenas, J. J., Nogueira-Rodrigues, A., Saunders, D., Stirling, B., von Bultzingslowen, I., Weikel, D. S., Elting, L. S., Spijkervet, F. K. und Brennan, M. T. (2010). **A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact**. *Support Care Cancer* 18, S. 1061-1079, doi: 10.1007/s00520-010-0837-6.
- Jha, N., Seikaly, H., McGaw, T. und Coulter, L. (2000). **Submandibular salivary gland transfer prevents radiation-induced xerostomia**. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46, S. 7-11, doi: 10.1016/s0360-3016(99)00460-5.
- Jones, C. M. und Smith, J. C. (1998). **Establishment of a BMP-4 morphogen gradient by long-range inhibition**. *Dev Biol* 194, S. 12-17, doi: 10.1006/dbio.1997.8752.

- Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J. und Atala, A. (2007). **In-vitro reconstitution of three-dimensional human salivary gland tissue structures**. *Differentiation* 75, S. 318-324, doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00138.x.
- Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J. J. und Atala, A. (2005). **Tissue engineering of functional salivary gland tissue**. *Laryngoscope* 115, S. 244-248, doi: 10.1097/01.mlg.0000154726.77915.cc.
- Kim, D. H., Han, K., Gupta, K., Kwon, K. W., Suh, K. Y. und Levchenko, A. (2009). **Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients**. *Biomaterials* 30, S. 5433-5444, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.042.
- Kleinman, H. K. und Martin, G. R. (2005). **Matrigel: basement membrane matrix with biological activity**. *Semin Cancer Biol* 15, S. 378-386, doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.004.
- Kleinsasser, N. H., Gamarra, F., Bergner, A., Wallner, B. C., Harreus, U. A., Juchhoff, J., Kastenbauer, E. R. und Huber, R. M. (2001). **Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay**. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63, S. 141-147, doi: 55730.
- Kleinsasser, N. H., Harreus, U. A., Gamarra, F., Driemel, O., Hagen, R. und Buehrlen, M. (2009). **Cytochrome P450A6 stability in a mini organ culture model of human nasal mucosa for genotoxicology studies as detected by flow cytometry**. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266, S. 385-389, doi: 10.1007/s00405-008-0774-x.
- Kleinsasser, N. H., Juchhoff, J., Wallner, B. C., Bergner, A., Harreus, U. A., Gamarra, F., Buehrlen, M., Huber, R. M. und Rettenmeier, A. W. (2004). **The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology**. *Mutat Res* 561, S. 63-73, doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.03.013.
- Kolb, E. (2018) **Beurteilung des Wachstumsverhaltens von nativen, humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen auf einer Matrix aus dezellularisierter, porciner Speicheldrüse**. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Kück, U., Bunse, A., Holländer-Czytko, H., Jeske, S. und Klämbt, C. (2005). **PCR-Analytik**. In: **Praktikum der Molekulargenetik**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 221-241.
- Langer, R. und Vacanti, J. P. (1993). **Tissue engineering**. *Science* 260, S. 920-926, doi: 10.1126/science.8493529.
- Lequin, R. M. (2005). **Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**. *Clin Chem* 51, S. 2415-2418, doi: 10.1373/clinchem.2005.051532.

- Liang, G. B., Zhang, G. P., Jin, H. M. und Qian, R. Z. (2004). **[Dynamic changes in focal adhesion kinase during cell migration induced by bFGF and the significance]**. *Sheng Li Xue Bao* 56, S. 509-514, pmcid: 15322688.
- Lofink, F., Hankemeier, S., Fromter, R., Kirschner, J. und Oepen, H. P. (2012). **Long-time stability of a low-energy electron diffraction spin polarization analyzer for magnetic imaging**. *Rev Sci Instrum* 83, URL: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3685629> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1063/1.3685629.
- Lombaert, I. M., Brunsting, J. F., Wierenga, P. K., Faber, H., Stokman, M. A., Kok, T., Visser, W. H., Kampinga, H. H., de Haan, G. und Coppes, R. P. (2008). **Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands**. *PLoS One* 3, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2329592> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1371/journal.pone.0002063.
- Lombaert, I. M., Wierenga, P. K., Kok, T., Kampinga, H. H., deHaan, G. und Coppes, R. P. (2006). **Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands**. *Clin Cancer Res* 12, S. 1804-1812, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2381.
- Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A. und Griffith, L. G. (2000). **Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering**. *J Cell Sci* 113 ( Pt 10), S. 1677-1686, pmcid: 10769199.
- Mak, M., Reinhart-King, C. A. und Erickson, D. (2011). **Microfabricated physical spatial gradients for investigating cell migration and invasion dynamics**. *PLoS One* 6, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21695222> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1371/journal.pone.0020825.
- Malik, Z., Dishi, M. und Garini, Y. (1996). **Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells**. *Photochem Photobiol* 63, S. 608-614, doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb05663.x.
- Maria, O. M., Maria, A. M., Cai, Y. und Tran, S. D. (2012). **Cell surface markers CD44 and CD166 localized specific populations of salivary acinar cells**. *Oral Dis* 18, S. 162-168, doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01858.x.
- Matsuzaki, T., Suzuki, T., Koyama, H., Tanaka, S. und Takata, K. (1999). **Aquaporin-5 (AQP5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation**. *Cell Tissue Res* 295, S. 513-521, doi: 10.1007/s004410051257.
- Merkle, H. P., Ditzinger, G., Lang, S. R., Peter, H. und Schmidt, M. C. (1998). **In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism**. *Adv Drug Deliv Rev* 29, S. 51-79, doi: 10.1016/s0169-409x(97)00061-6.

- Mishra, R. (2012). **Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application.** *Oral Oncol* 48, S. 578-584, doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.01.017.
- Mitchison, T. J. und Cramer, L. P. (1996). **Actin-based cell motility and cell locomotion.** *Cell* 84, S. 371-379, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81281-7.
- Moll, C., Reboredo, J., Schwarz, T., Appelt, A., Schurlein, S., Walles, H. und Nietzer, S. (2013). **Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system.** *J Vis Exp* 2013, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3846813> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.3791/50460.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. und Krepler, R. (1982). **The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell* 31, S. 11-24, doi: 10.1016/0092-8674(82)90400-7.
- Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T. und Matsumoto, K. (2011). **Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26, S. 188-202, doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06549.x.
- Nanduri, L. S., Lombaert, I. M., van der Zwaag, M., Faber, H., Brunsting, J. F., van Os, R. P. und Coppes, R. P. (2013). **Salisphere derived c-Kit+ cell transplantation restores tissue homeostasis in irradiated salivary gland.** *Radiother Oncol* 108, S. 458-463, doi: 10.1016/j.radonc.2013.05.020.
- Nelson, J., Manzella, K. und Baker, O. J. (2013). **Current cell models for bioengineering a salivary gland: a mini-review of emerging technologies.** *Oral Dis* 19, S. 236-244, doi: 10.1111/j.1601-0825.2012.01958.x.
- Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M. und Lee, J. H. (2007). **In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method.** *Biomaterials* 28, S. 1664-1671, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.024.
- Ono, H., Obana, A., Usami, Y., Sakai, M., Nohara, K., Egusa, H. und Sakai, T. (2015). **Regenerating Salivary Glands in the Microenvironment of Induced Pluripotent Stem Cells.** *Biomed Res Int* 2015, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4491559>, doi: 10.1155/2015/293570.
- Orellana, M. F., Lagravere, M. O., Boychuk, D. G., Major, P. W. und Flores-Mir, C. (2006). **Prevalence of xerostomia in population-based samples: a systematic review.** *J Public Health Dent* 66, S. 152-158, doi: 10.1111/j.1752-7325.2006.tb02572.x
- Ozdemir, T., Srinivasan, P. P., Zakheim, D. R., Harrington, D. A., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C., Jia, X. und Pradhan-Bhatt, S. (2017). **Bottom-up assembly of salivary gland microtissues for assessing myoepithelial cell function.** *Biomaterials* 142, S. 124-135, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.022.

- Pelham, R. J. und Wang, Y.-I. (1997). **Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, S. 13661-13665, doi: 10.1073/pnas.94.25.13661.
- Peppas, N. A. und Langer, R. (1994). **New challenges in biomaterials**. *Science* 263, S. 1715-1720, doi: 10.1126/science.8134835.
- Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F. und Ferlay, J. (1999). **Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990**. *Int J Cancer* 83, S. 18-29, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990924)83:1<18::aid-ijc5>3.0.co;2-m.
- Pradhan-Bhatt, S., Harrington, D. A., Duncan, R. L., Farach-Carson, M. C., Jia, X. und Witt, R. L. (2014). **A novel in vivo model for evaluating functional restoration of a tissue-engineered salivary gland**. *Laryngoscope* 124, S. 456-461, doi: 10.1002/lary.24297.
- Pradhan-Bhatt, S., Harrington, D. A., Duncan, R. L., Jia, X., Witt, R. L. und Farach-Carson, M. C. (2013). **Implantable three-dimensional salivary spheroid assemblies demonstrate fluid and protein secretory responses to neurotransmitters**. *Tissue Eng Part A* 19, S. 1610-1620, doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0301.
- Pradhan, S., Liu, C., Zhang, C., Jia, X., Farach-Carson, M. C. und Witt, R. L. (2010). **Lumen formation in three-dimensional cultures of salivary acinar cells**. *Otolaryngol Head Neck Surg* 142, S. 191-195, doi: 10.1016/j.otohns.2009.10.039.
- Raftopoulou, M. und Hall, A. (2004). **Cell migration: Rho GTPases lead the way**. *Developmental Biology* 265, S. 23-32, doi: 10.1016/j.ydbio.2003.06.003.
- Ramón y Cajal, S. (1892). **La rétine des vertébrés**. In: **La Cellule**, Van In [etc.], Lierre [etc.], S. 119–258.
- Redd, M. J., Kelly, G., Dunn, G., Way, M. und Martin, P. (2006). **Imaging macrophage chemotaxis in vivo: studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation**. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, S. 415-422, doi: 10.1002/cm.20133.
- Robert-Koch-Institut (2016). **Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016** (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, Berlin), doi: 10.17886/EpiBull-2017-005.
- Robert-Koch-Institut (2017). **Krebs in Deutschland für 2013/2014** (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, Berlin), doi: 10.17886/rkipubl-2017-007.
- Rothmann, C., Malik, Z. und Cohen, A. M. (1998). **Spectrally resolved imaging of Cabot rings and Howell-Jolly bodies**. *Photochem Photobiol* 68, S. 584-587, doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb02517.x

- Roy, T. D., Simon, J. L., Ricci, J. L., Rekow, E. D., Thompson, V. P. und Parsons, J. R. (2003). **Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques.** *J Biomed Mater Res A* 66, S. 283-291, doi: 10.1002/jbm.a.10582.
- Rudat, V., Munter, M., Rades, D., Grotz, K. A., Bajrovic, A., Haberkorn, U., Brenner, W. und Debus, J. (2008). **The effect of amifostine or IMRT to preserve the parotid function after radiotherapy of the head and neck region measured by quantitative salivary gland scintigraphy.** *Radiother Oncol* 89, S. 71-80, doi: 10.1016/j.radonc.2008.07.016.
- Saad, B., Ciardelli, G., Matter, S., Welte, M., Uhlschmid, G. K., Neuenschwander, P. und Suter, U. W. (1998). **Degradable and highly porous polyesterurethane foam as biomaterial: effects and phagocytosis of degradation products in osteoblasts.** *J Biomed Mater Res* 39, S. 594-602, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19980315)39:4<594::aid-jbm14>3.0.co;2-7
- Saibishkumar, E. P., Jha, N., Scrimger, R. A., MacKenzie, M. A., Daly, H., Field, C., Fallone, G. und Parliament, M. B. (2007). **Sparing the parotid glands and surgically transferred submandibular gland with helical tomotherapy in post-operative radiation of head and neck cancer: a planning study.** *Radiother Oncol* 85, S. 98-104, doi: 10.1016/j.radonc.2007.09.014.
- Schlesinger-Raab, A., Harréus, U., Schubert-Fritschle, G. und Engel, J. (2014). **Epidemiologie der Kopf-Hals-Tumoren.** In: **Manual Kopf-Hals-Malignome**, Hrsg. Hast, G., 5. Aufl., Tumorzentrum München, S. 9-16.
- Shubin, A. D., Felong, T. J., Graunke, D., Ovitt, C. E. und Benoit, D. S. (2015). **Development of poly(ethylene glycol) hydrogels for salivary gland tissue engineering applications.** *Tissue Eng Part A* 21, S. 1733-1751, doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0674.
- Singh, N. P., Danner, D. B., Tice, R. R., Pearson, J. D., Brant, L. J., Morrell, C. H. und Schneider, E. L. (1991). **Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age.** *Mutat Res* 256, S. 1-6, doi: 10.1016/0921-8734(91)90026-8
- Skalak, R. und Fox, C. (1988). **Tissue engineering.** Beitrag präsentiert bei: NSF Workshop, UCLA Symp. Molecular and Cellular Biology (New York: Alan R. Liss).
- Somia, N. und Verma, I. M. (2000). **Gene therapy: trials and tribulations.** *Nat Rev Genet* 1, S. 91-99, doi: 10.1038/35038533.
- Stenhamre, H., Nannmark, U., Lindahl, A., Gatenholm, P. und Brittberg, M. (2011). **Influence of pore size on the redifferentiation potential of human articular chondrocytes in poly(urethane urea) scaffolds.** *J Tissue Eng Regen Med* 5, S. 578-588, doi: 10.1002/term.350.

- Sterzing, F., Engenhardt-Cabillic, R., Flentje, M. und Debus, J. (2011). **Image-guided radiotherapy: a new dimension in radiation oncology**. *Dtsch Arztebl Int* 108, S. 274-280, doi: 10.3238/arztebl.2011.0274.
- Strober, W. (1997). **Trypan blue exclusion test of cell viability**. *Curr Protoc Immunol* 21, S. Appendix 3B1-B2, doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- Sugito, T., Kagami, H., Hata, K., Nishiguchi, H. und Ueda, M. (2004). **Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland**. *Cell Transplant* 13, S. 691-699, doi: 10.3727/000000004783983567.
- Sumita, Y., Liu, Y., Khalili, S., Maria, O. M., Xia, D., Key, S., Cotrim, A. P., Mezey, E. und Tran, S. D. (2011). **Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation**. *Int J Biochem Cell Biol* 43, S. 80-87, doi: 10.1016/j.biocel.2010.09.023.
- Swartz, M. A. und Fleury, M. E. (2007). **Interstitial flow and its effects in soft tissues**. *Annu Rev Biomed Eng* 9, S. 229-256, doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151850.
- Szlavik, V., Szabo, B., Vicsek, T., Barabas, J., Bogdan, S., Gresz, V., Varga, G., O'Connell, B. und Vag, J. (2008). **Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract**. *Tissue Eng Part A* 14, S. 1915-1926, doi: 10.1089/ten.tea.2007.0208.
- Tampieri, A., Celotti, G., Sprio, S., Delcogliano, A. und Franzese, S. (2001). **Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone**. *Biomaterials* 22, S. 1365-1370, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00290-8.
- Tran, S. D., Sugito, T., Dipasquale, G., Cotrim, A. P., Bandyopadhyay, B. C., Riddle, K., Mooney, D., Kok, M. R., Chiorini, J. A. und Baum, B. J. (2006). **Re-engineering primary epithelial cells from rhesus monkey parotid glands for use in developing an artificial salivary gland**. *Tissue Eng* 12, S. 2939-2948, doi: 10.1089/ten.2006.12.2939.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. (2002). **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes**. *Genome Biol* 3, URL: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-research0034> [Stand: 28.02.2020], doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Vasquez, M. M., Mustafa, S. B., Choudary, A., Seidner, S. R. und Castro, R. (2009). **Regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) in the salivary cell line SMG-C6**. *Exp Biol Med (Maywood)* 234, S. 522-531, doi: 10.3181/0806-rm-209.
- von Ardenne, M. (1938). **Das Elektronen-Rastermikroskop**. *Zeitschrift für Physik* 109, S. 553-572, doi: 10.1007/bf01341584.
- Walsh, G. M., Dewson, G., Wardlaw, A. J., Levi-Schaffer, F. und Moqbel, R. (1998). **A comparative study of different methods for the assessment of**
-

- apoptosis and necrosis in human eosinophils.** *J Immunol Methods* 217, S. 153-163, doi: 10.1016/s0022-1759(98)00103-3.
- Wang, Y., Shnyra, A., Africa, C., Warholic, C. und McArthur, C. (2009). **Activation of the extrinsic apoptotic pathway by TNF-alpha in human salivary gland (HSG) cells in vitro, suggests a role for the TNF receptor (TNF-R) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in Sjogren's syndrome-associated autoimmune sialadenitis.** *Arch Oral Biol* 54, S. 986-996, doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.07.011.
- Warner, J. D., Peters, C. G., Saunders, R., Won, J. H., Betzenhauser, M. J., Gunning, W. T., 3rd, Yule, D. I. und Giovannucci, D. R. (2008). **Visualizing form and function in organotypic slices of the adult mouse parotid gland.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, S. G629-640, doi: 10.1152/ajpgi.90217.2008.
- Wasserman, T. H., Brizel, D. M., Henke, M., Monnier, A., Eschwege, F., Sauer, R. und Strnad, V. (2005). **Influence of intravenous amifostine on xerostomia, tumor control, and survival after radiotherapy for head-and-neck cancer: 2-year follow-up of a prospective, randomized, phase III trial.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63, S. 985-990, doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.07.966.
- Wiese, H. und Maier, G. (2006). **Open-pored polyurethane foam without skin formation, formulation for the production thereof and use thereof as a carrier material for cell and tissue cultures or medicaments.** *PCT Int Appl* 37, patent: WO 2006/032501 A1.
- Wong, J. Y., Velasco, A., Rajagopalan, P. und Pham, Q. (2003). **Directed Movement of Vascular Smooth Muscle Cells on Gradient-Compliant Hydrogels†.** *Langmuir* 19, S. 1908-1913, doi: 10.1021/la026403p.
- Woodfield, T. B., Van Blitterswijk, C. A., De Wijn, J., Sims, T. J., Hollander, A. P. und Riesle, J. (2005). **Polymer scaffolds fabricated with pore-size gradients as a model for studying the zonal organization within tissue-engineered cartilage constructs.** *Tissue Eng* 11, S. 1297-1311, doi: 10.1089/ten.2005.11.1297.
- Woods, N. B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C. und Verma, I. M. (2006). **Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma.** *Nature* 440, S. 1123, doi: 10.1038/4401123a.
- Wu, J., Mao, Z. und Gao, C. (2012). **Controlling the migration behaviors of vascular smooth muscle cells by methoxy poly(ethylene glycol) brushes of different molecular weight and density.** *Biomaterials* 33, S. 810-820, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.022.
- Xiao, N., Lin, Y., Cao, H., Sirjani, D., Giaccia, A. J., Koong, A. C., Kong, C. S., Diehn, M. und Le, Q. T. (2014). **Neurotrophic factor GDNF promotes survival of salivary stem cells.** *J Clin Invest* 124, S. 3364-3377, doi: 10.1172/jci74096.

- Xiong, X., Shi, X. und Chen, F. (2014). **Human adipose tissue-derived stem cells alleviate radiation-induced xerostomia.** *Int J Mol Med* 34, S. 749-755, doi: 10.3892/ijmm.2014.1837.
- Yagi, H., Soto-Gutierrez, A. und Kitagawa, Y. (2013). **Whole-organ re-engineering: a regenerative medicine approach to digestive organ replacement.** *Surg Today* 43, S. 587-594, doi: 10.1007/s00595-012-0396-1.
- Yoda, R. (1998). **Elastomers for biomedical applications.** *J Biomater Sci Polym Ed* 9, S. 561-626, doi: 10.1163/156856298x00046
- Zaari, N., Rajagopalan, P., Kim, S. K., Engler, A. J. und Wong, J. Y. (2004). **Photopolymerization in Microfluidic Gradient Generators: Microscale Control of Substrate Compliance to Manipulate Cell Response.** *Advanced Materials* 16, S. 2133-2137, doi: 10.1002/adma.200400883.
- Zabel, A., Thilmann, C., Zuna, I., Schlegel, W., Wannemacher, M. und Debus, J. (2002). **Comparison of forward planned conformal radiation therapy and inverse planned intensity modulated radiation therapy for esthesioneuroblastoma.** *Br J Radiol* 75, S. 356-361, doi: 10.1259/bjr.75.892.750356.



## 8 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich meinen besonderen Dank meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser für seine wissenschaftliche, sorgfältige und methodische Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses meiner Dissertation aussprechen. Seine unermüdliche Beratung war für die Durchführung und schriftliche Ausarbeitung der Arbeit essenziell. Er ermöglichte es mir, in der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenkrankheiten und plastische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg, meine Promotionsarbeit durchführen zu können.

Frau PD Dr. Katrin Radeloff danke ich für Ihre Ratschläge und Anmerkungen binnen eines Teils des Weges zur fertigen Arbeit.

Außerdem möchte ich meinen Dank Herrn PD Dr. Marco Metzger ausdrücken, der mich bei der Bearbeitung durch Hilfestellung begleitet und fachkundige Kritik unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Mitarbeitern des Labors der AG Kleinsasser, die mich sehr freundlich empfangen und stets ein offenes Ohr für meine Belange hatten: Dipl.-Biol. Dr. Gudrun Steußloff, Petra Joa, Dipl.-Biol. Dr. Antje Technau, Michael Kessler, Margarete Appelmann, Silke Hummel, Renate Port und Karin Jung.

Des Weiteren bedanke ich mich für die Einblicke und hilfreichen Erkenntnisse bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Evelyn Kolb bedanken, mit der ich die Werkbank im Labor geteilt habe. Auch in kniffliger Situation konnte ich auf Ihre fachkundige Unterstützung bauen.

Danksagen möchte ich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Professor Dr. Georg Krohne für die Anfertigung der Rasterelektronenaufnahmen am Biozentrum der Universität Würzburg.

Aus tiefstem Herzen möchte ich meinen Eltern danken, die mich den langen Weg während der Arbeit begleitet haben, seelisch Halt gaben und mich mit Rat und Tat unterstützt haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Ehefrau danken, die mich immer wieder bestärkt und motiviert hat.

---



## **10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, die Dissertation Experimentelle Doktorarbeit mit dem Thema: „Kultivierung von humanem Speicheldrüsengewebe in einer dreidimensionalen Polyurethanmatrix“ 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.

Würzburg, 27.02.2020

---

Serge - Peer Ströhle

---