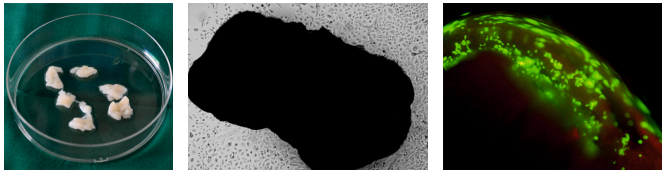


EVELYN KOLB

Beurteilung des Wachstumsverhaltens
von nativen, humanen und porcinen
Speicheldrüsenzellen auf einer Matrix
aus dezellularisierter, porciner
Speicheldrüse



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. S. Arnhold
und
der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische
und ästhetische Operationen
der Universität Würzburg
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med N. Kleinsasser MHBA

**Beurteilung des Wachstumsverhaltens von nativen,
humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen auf einer
Matrix aus dezellularisierter, porciner Speicheldrüse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Evelyn Kolb

Tierärztin aus Filderstadt

Gießen 2017

**Mit der Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

Univ.-Prof. Dr. med. N. Kleinsasser MHBA

Tag der Disputation: 04.12.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Xerostomie als Folge der Bestrahlungstherapie von malignen Kopf-Hals-Tumoren.....	1
1.2 Inzidenz von Kopf-Hals-Tumoren.....	3
1.3 Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren.....	4
1.4 Bisherige Therapieoptionen bei Xerostomie.....	5
1.4.1 Medikamentöse Therapie	5
1.4.2 Operative und strahlentherapeutische Verfahren.....	6
1.4.3 Gentherapeutische Regenerationsstrategien.....	7
1.4.4 Regeneration durch Stammzellen.....	8
1.4.5 Alternative Verfahren.....	8
1.5 Organersatz durch Tissue Engineering.....	8
1.6 Ziele der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Gewinnung und Weiterverarbeitung der porcinen Glandula mandibularis.....	11
2.1.1 Gewinnung der porcinen Glandula mandibularis	11
2.1.2 Dezellularisierung der porcinen Glandula mandibularis	12
2.2 Charakterisierung der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüse	13
2.2.1 Überprüfung des Dezellularisierungserfolgs durch die Feulgenfärbung	13
2.2.2 Messung des DNA-Gehalts von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse anhand des Quanti-iT™ PicoGreen® ds DNA Assays	13
2.2.3 Messung des Elastingehalts von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse anhand des Fastin™ Elastin Assays	16
2.2.4 Messung des Kollagengehalts von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse anhand des Sircol™ Soluble Collagen Assays.....	18
2.2.5 Gallensäuretestung anhand des Total Bile Acids Assay Kits	19
2.3 Gewinnung und Kultivierung von primären Speicheldrüsenzellen	21
2.3.1 Operative Gewinnung von humanem Parotisgewebe	21
2.3.2 Kultivierung von primären Speicheldrüsenzellen der Glandula parotidea und porcinen Speicheldrüsenzellen der Glandula mandibularis	21
2.3.3 Passagieren und Zählung der Zellen unter Verwendung des Trypanblau-Vitalitätstests	22
2.4 RNA-Isolierung von humanem Parotisgewebe und <i>in vitro</i> kultivierten, humanen Parotiszellen	24
2.4.1 Grundlagen der RNA-Isolierung.....	24
2.4.2 Durchführung der RNA-Isolation von humanem Parotisgewebe	24

2.4.3	Durchführung der RNA-Isolation von <i>in vitro</i> kultivierten, humanen Parotiszellen	26
2.4.4	Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben	26
2.5	cDNA-Synthese aus isolierter RNA.....	27
2.5.1	Grundlagen der cDNA-Synthese	27
2.5.2	Durchführung der cDNA-Synthese	27
2.6	Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion zur Funktionstestung der Primer α-Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5	28
2.6.1	Grundlagen der Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion	28
2.6.2	Durchführung der Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion	28
2.6.3	Gelelektrophorese zur Auftrennung der Nukleotide	29
2.7	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion zur Analyse der cDNA von <i>in vitro</i> kultivierten, humanen Parotiszellen.....	30
2.7.1	Grundlagen der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	30
2.7.2	Durchführung der quantitativen Real-Time Polymerase Kettenreaktion	31
2.7.3	Analyse der relativen Genexpression	32
2.8	Charakterisierung der humanen Parotiszellen durch Immunfluoreszenzdarstellung.....	33
2.8.1	Grundlagen der Immunfluoreszenzfärbung.....	33
2.8.2	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit Verwendung der Antikörper α -Amylase, Aquaporin 5 und Pan-Cytokeratin	33
2.9	Besiedelung von dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücken	35
2.9.1	Allgemeines Besiedelungsprotokoll	35
2.9.2	Besiedelungsversuche im Überblick	36
2.9.3	Pilotstudie: Besiedelungsversuche mit humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Fibrinkleber.....	37
2.9.4	Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Laminin/Fibronectin, Kollagen Typ I, Fibroblasten oder Fibrinkleber	38
2.9.5	Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Hydrogel	39
2.10	Fluoreszenzfärbung der Konstrukte und der nicht-anhaftenden Zellen auf dem Wellboden	40
2.10.1	Vitalfärbung mit Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid	40
2.10.2	DAPI-Färbung	41
2.11	Herstellung von Kryo- und Paraffinschnitten.....	41
2.11.1	Kryokonservierung.....	41
2.11.2	Herstellung von Kryoschnitten	42
2.11.3	Paraffineinbettung	42
2.11.4	Herstellung von Paraffinschnitten	43
2.12	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	44
2.12.1	Grundlagen.....	44
2.12.2	Vorbereitung der Paraffinschnitte für die Färbungen.....	44
2.12.3	Färbung von Kryo- und Paraffinschnitten.....	45

2.13	Elektronenmikroskopie	45
2.13.1	Rasterelektronenmikroskopie	45
2.13.2	Transmissionselektronenmikroskopie	46
2.14	Statistische Verfahren	48
2.15	Graphische Darstellung der Ergebnisse	48
3	<i>Ergebnisse</i>	49
3.1	Charakterisierung der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüse	49
3.1.1	Makroskopische Betrachtung von nativem und dezellularisiertem Speicheldrüsengewebe	49
3.1.2	Auswertung histologischer Schnitte von dezellularisiertem und nativem Speicheldrüsengewebe	49
3.1.3	DNA-Gehalt-Messung von dezellularisiertem und nativem, porcinen Speicheldrüsengewebe	51
3.1.4	Elastingehalt-Messung von dezellularisiertem und nativem, porcinen Speicheldrüsengewebe	52
3.1.5	Kollagengehalt-Messung von dezellularisiertem und nativem, porcinen Speicheldrüsengewebe	53
3.1.6	Gallensäuretest zur Bewertung des Desoxycholsäuregehalts im Überstand der dezellularisierten Speicheldrüsenstücke	54
3.2	Charakterisierung der humanen Parotiszellen	55
3.2.1	Kultivierungserfolg der humanen Parotiszellen in 2-dimensionalen Monokultur	55
3.2.2	Auswertung der Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion für die Primer α -Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5	56
3.2.3	Nachweis von α -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 18 in humanen Parotiszellen und humanem Parotisgewebe mittels quantitativer Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	57
3.2.4	Nachweis von α -Amylase, Aquaporin 5 und Pan-Cytokeratin in humanen Parotiszellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen	59
3.2.5	Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen von humanen Parotiszellen in 2-dimensionalen Monokultur	63
3.3	Auswertung der Besiedelungsversuche von dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücken als Matrix	64
3.3.1	Pilotstudie: Auswertung der ersten Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Fibrinkleber	64
3.3.2	Auswertung der Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Laminin/Fibronectin, Kollagen, Fibroblasten oder Fibrinkleber	66
3.3.3	Auswertung der Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Hydrogel	71
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4	<i>Diskussion</i>	77
4.1	Tissue Engineering	77
4.2	Dezellularisierung von Organen und Geweben	78
4.3	Charakterisierung von dezellularisierter, porciner Speicheldrüse	79
4.3.1	Dezellularisierungserfolg des porcinen Speicheldrüsengewebes	79

4.3.2	Bewertung des Gallensäuretests	80
4.3.3	Charakterisierung der extrazellulären Matrix.....	81
4.4	Kultivierung und Charakterisierung von humanen Parotiszellen in 2-dimensionalen Monokulturen	83
4.4.1	Kultivierung einer primären, adhärenz Zelle von Speicheldrüsenzellen	83
4.4.2	Charakterisierung der kultivierten, humanen Parotiszellen	84
4.4.3	Weitere Möglichkeiten zur Zellgewinnung.....	87
4.5	Beurteilung der Besiedelungsversuche	88
4.5.1	Besiedelungsversuche von dezellularisierten Speicheldrüsenstücken mit humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen	88
4.5.2	Funktionalisierung der Oberfläche der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüse vor Besiedelung mit humanen Speicheldrüsenzellen	91
4.5.3	Suche nach geeigneten Matrices für die Besiedelung mit humanen Speicheldrüsenzellen.....	93
4.6	Ausblick	94
5	Zusammenfassung	96
6	Summary	98
7	Anhang	100
7.1	Materialien	100
7.1.1	Geräte	100
7.1.2	Verbrauchs- und Labormaterialien.....	102
7.1.3	Chemikalien, Nährmedien und Zusätze	104
7.1.4	Software, Antikörper, Kits, Primer.....	107
7.2	Tabellen der Messergebnisse	110
7.2.1	PCR-Ergebnisse.....	110
7.2.2	Immunfluoreszenz	113
7.2.3	Werte der Messkurven.....	114
8	Literaturverzeichnis.....	116
9	Danksagung	125
10	Eidesstattliche Erklärung.....	127

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AM	Amylase
AQ	Aquaporin
BEGM	Bronchialepithelialzellen-Wachstumsmedium (bronchial epithelial growth medium)
BME	Basalmembranextrakt (basement membrane extract)
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-Wert	Zyklusschwellenwert (cycle threshold)
CY	Cytokeratin
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium (Dulbecco's modified eagle medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EB	Ethidiumbromid
EF1 α	Elongationsfaktor 1-alpha (elongation factor 1-alpha)
EHS	Englebretth-Holm-Swarm
EZM	Extrazelluläre Matrix (Extrazellulärmatrix)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FDA	Fluoresceindiacetat
FDA	Amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel (US Food and Drug Administration)
FGF	Gen für einen Wachstumsfaktor für Fibroblasten (fibroblast growth factor)
g	Gramm
GAGs	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-colony stimulating factor)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO	Hals-Nasen-Ohren
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPV	Humane Papillomaviren
HPZ	Humane Parotiszellen
HZ	Hertz
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
kGy	Kilogray
Lsg.	Lösung
M	Molare Masse
mA	Milliampere
MEGM	Brustdrüsenepitheliales Wachstumsmedium (mammary epithelial growth medium)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Kochsalzlösung (Natriumchlorid)
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NSF	Nationale Wissenschaftsstiftung (national science foundation)
PLA	Poly-L-Milchsäure (Poly-L-lactic acid)
PSZ	Schweinespeicheldrüsenzellen (porcine Speicheldrüsenzellen)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Pat.	Patient
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered solution)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pmol	Pikomol
PFA	Paraformaldehyd
RGE	Relative Genexpression
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMIM	Roswell Park Memorial Institute Medium
SD	Speicheldrüse
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
SIS-Matrix	Dünndarmsubmukosa-Matrix (small intestinal submucosa matrix)
TAE buffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
Thio-NAD	Thio-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
ÜS	Überstand
VEGF	Gen für einen Wachstumsfaktor des Gefäßendothels (vascular endothelial growth factor)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organisation)

1 Einleitung

1.1 Xerostomie als Folge der Bestrahlungstherapie von malignen Kopf-Hals-Tumoren

Bei Patienten mit malignen Kopf-Hals-Tumoren stellt die chirurgische Entfernung mit anschließender Strahlentherapie die Hauptbehandlungsmethode dar (Dirix et al., 2006). Tumorpatienten, die eine Bestrahlungstherapie erhalten, erleiden meist einen irreversiblen Funktionsverlust des Speicheldrüsengewebes, wenn diese im Bestrahlungsfeld liegt. Die Xerostomie zählt zu der bedeutensten Nebenwirkung bei diesen Patienten. Die Speichelproduktion sinkt in Korrelation mit der Bestrahlungsdosis, da die speichelproduzierenden Azinuszellen irreversibel geschädigt werden (Bucheler, 2001). Die konventionelle Strahlenbehandlung von malignen Kopf-Hals-Tumoren wird in Dosierungen von 1,8 bis 2 Gy über 6-7 Wochen, bis hin zu Gesamtdosen zwischen 66 und 70 Gy gegeben (Ang et al., 2002). Während dieser konventionellen Strahlenbehandlung beginnt die strahleninduzierte Xerostomie schon sehr früh. In der ersten Woche nimmt der Speichelfluss um 50-60% ab, nach 7 Wochen ist nur noch ein 20%iger Speichelfluss vorhanden (Franzen et al., 1992). In der Studie der Arbeitsgruppe um Shannon sank der Speichelfluss der Patienten die ersten 6 Wochen nach einer Strahlenbehandlung mit Gesamtdosen zwischen 22,5-54 Gy bis auf 5% ab (Shannon et al., 1978). Ca. 2 Jahre nach der Strahlentherapie ist eine Besserung der Speicheldrüsenfunktion möglich, abhängig von der Bestrahlungsdosis und dem Volumen der Speicheldrüse, die im Bestrahlungsfeld lag (Valdez, 1991).

Seifert charakterisierte in seinem Buch „Speicheldrüsenkrankheiten“ die Strahlenschäden histologisch und teilte diese in 3 Phasen ein. Zuerst kommt es zur Schwellung der Drüse mit Vakuolenbildung, dann zur Atrophie der Drüsenzazini, Erweiterung der Speicheldrüsengänge und zur interstitiellen Fibrose. Im Terminalstadium sind Zerstörung der Drüsenzazini, Sekretstau und Gangektasien nachweisbar (Seifert et al. 1984). Seröse Azini sind empfindlicher als muköse Azini gegenüber Bestrahlung (Liem et al., 1996). Daraus ergibt sich eine erhöhte Strahlensensibilität der serösen Glandula parotidea (Rotter et al., 2010). Da die Azinuszellen für die Speichelproduktion verantwortlich sind (Redman, 2008), kommt es durch ihre Zerstörung zur lebenslangen Xerostomie. Es wird nicht nur weniger Speichel produziert, auch die Konsistenz des verbleibenden Restspeichels mit neutralem pH-Wert verändert sich zu einem dicken, zähen Speichel mit steigender Azidität. Die sich ergebenden Folgen sind sehr quälend

für den Patienten und schränken die Lebensqualität erheblich ein, auch wenn die Krebserkrankung selbst geheilt werden kann (Dirix et al., 2006).

Eine Untersuchung von 65 Patienten, die länger als 6 Monate nach der Bestrahlungstherapie überlebten, wies folgendes Ergebnis auf: 91,8% der Patienten klagten über einen trockenen Mund, 43% hatten Schwierigkeiten beim Kauen, 63,1% litten unter Schluckbeschwerden, 75,4% klagten über den Verlust des Geschmacks, 50,8% sprachen verändert, 48,5% hatten Probleme mit ihrem Zahnersatz, 38,5% mit kariösen Zähnen und 58,4% klagten über Schmerzen, die Auswirkungen auf die Tagesaktivität bei 30,8% der Patienten hatten (Epstein et al., 1999).

Ein gesunder Mensch produziert zwischen 0,5 und 1,5 Liter Speichel am Tag (Pedersen et al., 2002). 90% davon werden von den 3 großen paarig angelegten Speicheldrüsen Glandula parotidea, sublingualis und submandibularis produziert (Dirix et al., 2006). Auch ohne Nahrungsaufnahme wird der Mund kontinuierlich mit dem hauptsächlich mukösen Ruhespeichel befeuchtet. Dieser erfüllt eine Vielzahl von Aufgaben (Pedersen et al., 2002). So nimmt der Speichel durch die Verdünnung von aufgenommenen, säurehaltigen und kalorienreichen Nahrungsmitteln eine Spülfunktion der Mundhöhle ein und schützt die Mundschleimhaut und Zähne (Lenander-Lumikari et al., 2000). Es liegen ca. 2.000 verschiedene Proteine im Speichel vor, die verschiedene Funktionen haben. Dazu gehören die mukösen Glykoproteine wie Mucin, die einen Gleitfilm auf der Mundschleimhaut bilden und diese befeuchten. Dadurch schützen sie beim Kauen vor mechanischen Verletzungen und sind an der Bildung eines Speisebolus beteiligt. Die Trockenheit der Mundhöhle schafft eine höhere Prädisposition für Verletzungen der Mukosa und Ulzerationen (Sonis et al., 2002). Harte und trockene Speisen werden zum Problem. Das Kauen ist unangenehm und verursacht oft Schmerzen. Viele Patienten brauchen während des Essens mehrere Schlucke Wasser, da sonst der Speisebolus im Mund oder Hals stecken bleibt. (Logemann et al., 2003). Die dadurch entstehenden Kau- und Schluckprobleme erhöhen die Gefahr einer Aspirationspneumonie. Der Speichel spielt auch eine wichtige Rolle bei der Geschmackswahrnehmung (Pedersen et al., 2002). Durch den fehlenden Speichel können Geschmacksmoleküle nicht mehr gelöst werden und die Geschmacksrezeptorzellen in den Zungenpapillen stimulieren (Maes et al., 2002). So nehmen Patienten nicht nur durch die entstandenen Kau- und Schluckprobleme weniger Nahrung auf, sondern auch durch den fehlenden Geschmacksinn und leiden oftmals an Gewichtsverlust. Da sich die Lautbildung verändert, wirkt sich die

Xerostomie auf die Kommunikation des Patienten und seinen sozialen Austausch aus (Bucheler et al., 2002).

Eine weitere Aufgabe des Speichels besteht darin, das Kariesrisiko zu senken. Um die Auflösung der Mineralsalze der Zahnhartsubstanz aufzuhalten, ist der Speichel übersättigt mit Kalzium und Phosphat. Präzipitation von Kalziumphosphatkristallen werden durch Proteine wie Statherine (Schupbach et al., 2001) verhindert. Fluoride und Rhodanid sorgen für die Erhaltung des Zahnschmelzes. α -Amylase macht den Hauptanteil der Enzyme im Speichel aus (Hay und Bowen 1996) und wirkt antibakteriell, bindet Streptokokken und spielt damit für die Zahngesundheit eine wichtige Rolle (Scannapieco et al., 1993). Histatin, Laktoferrin und Sialoperoxidase sorgen zusätzlich für eine antibakterielle Wirkung und verhindern oder verzögern eine Kariesbildung (Pedersen et al., 2002). Durch den sinkenden pH-Wert im Speichel, den Verlust von mineralisierenden Faktoren und veränderten Immunglobulinen steigt das Risiko für Karies (Spak et al., 1994). Die Reduktion des Speichelflusses trägt auch zum Risiko von Osteonekrosen der Mandibula durch den sinkenden Gehalt an Bikarbonaten im Speichel bei (Kumar et al., 1992).

Um Patienten zu helfen, die nach einer Bestrahlungstherapie an einer Xerostomie und deren Folgen leiden, werden neue Lösungsansätze in der Forschung verfolgt.

1.2 Inzidenz von Kopf-Hals-Tumoren

Unter dem Begriff Kopf-Hals-Tumore werden verschiedene Krebsarten, die im Kopf- und Halsbereich auftreten, zusammengefasst. Dazu zählen bösartige Tumore der Mundhöhle, des Rachens, des Kehlkopfes, der Nase, der Nasennebenhöhlen und des äußeren Halses (DKG Krebsgesellschaft, Onko Internetportal: Kopf-Hals-Tumoren). Weltweit erkranken jährlich mehr als 550.000 Menschen an Kopf-Hals-Tumoren. Ca. 300.000 Todesfälle werden jährlich gemeldet (Jemal et al., 2011). In Kanada, Dänemark, Niederlande, Norwegen, Schweden, den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und im Vereinigten Königreich (UK) kann man eine steigende Tendenz von oropharyngealem Mundhöhlenkrebs erkennen (Chaturvedi et al., 2013). Über 90% aller Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome. Der Anteil an Männern zu Frauen, die weltweit erkranken, schwankt zwischen 2:1 und 4:1 (Jemal et al., 2007). In Deutschland sind ca. 3 mal so viele Männer an Tumoren der Mundhöhle und des Rachens betroffen wie Frauen. Insgesamt werden pro Jahr in Deutschland ca. 12.940

Neuerkrankungen registriert. Im Durchschnitt erkranken Männer im Alter von 62 Jahren, Frauen im Alter von 66 Jahren. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt zwischen 48-61%. Seit dem Jahr 2000 hat sich die Erkrankungs- und Sterberate nicht wesentlich verändert. Zusätzlich erkranken in Deutschland jährlich 3.600 Menschen an Tumoren des Kehlkopfes und 910 Menschen an Tumoren der Nase, Nasennebenhöhlen und des Mittelohres (Robert-Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2011/2012), was eine insgesamte Neuerkrankung an Kopf- und Halstumoren von 17.450 Menschen jährlich ausmacht.

1.3 Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren

Es gibt verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren. Zu den Wichtigsten zählen der Konsum von Tabak und Alkohol (Righini et al., 2008). 75% aller Patienten mit Kopf- und Hals-Karzinomen rauchen. Die Menge und die Dauer erhöhen das Risiko. Tabak enthält viele mögliche Kanzerogene wie Nitrosamine und aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen wie 3,4-Benzpyren. Ein zusätzlicher Alkoholabusus erhöht die Permeabilität der Mundschleimhaut für Kanzerogene des Tabaks. Die Arbeitsgruppe um Boing beschrieb, dass sozioökologische Unterschiede wie niedrige Schulbildung das Risiko für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren erhöhen können, was aber in Verbindung mit dem erhöhten Alkohol- und Tabakkonsum in diesen Schichten gebracht wird (Boing et al., 2011). Auch genetische Komponenten werden als Risikofaktoren bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren diskutiert. Es werden Gen-Umwelt-Interaktionen vermutet, die durch Studien noch nicht belegt sind (Conway et al., 2009). Zunehmend in den Fokus rückt die Humane Papillomavirus-Infektion HPV. Weltweit steigen die Fälle von oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, was in Beziehung zu einer HPV-Infektion gesetzt wird. Die Mehrheit der HPV-bedingten Plattenepithelkarzinome wird durch den HPV-Typ 16 verursacht (Ahn et al., 2014). Das Virus kann zelluläre Antionkogene inaktivieren, v. a. das p53-Tumorsuppressorgen, und somit die Entstehung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen begünstigen (Snow et al., 2010). Allgemeine Erkrankungen wie eine HIV-Infektion (Engsig et al., 2011), Karies, Parodontitis oder eine Organtransplantation mit entsprechender Immunsuppression und eine nicht ausgewogene vitaminarme Ernährung können eine Rolle für die Tumorentstehung von Kopf- und Hals spielen. Eine höhere Aufnahme von Obst und Gemüse und reduzierte Aufnahme von rotem Fleisch senken das Risiko (Chuang et al., 2012).

1.4 Bisherige Therapieoptionen bei Xerostomie

1.4.1 Medikamentöse Therapie

Das als Parasympathomimetikum verwendete Medikament Pilocarpin bindet wie Acetylcholin an Muskarinrezeptoren und steigert so die Sekretion exokriner Drüsen wie Speichel-, Schweiß-, Tränen-, Bauchspeichel-, Magen- und Darmdrüsen. Zusätzlich wird es für die Glaukombehandlung eingesetzt, um den Augeninnendruck zu senken. Es ist das einzige Medikament, welches von der Amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (US Food and Drug Administration, FDA) für die Therapie der postradiogenen Mundtrockenheit zugelassen ist. In einer Phase 3-Studie zeigte sich zwar eine erhöhte Speichelproduktion durch die Gabe von Pilocarpin bei Patienten mit einer Bestrahlungstherapie von Kopf- und Hals, jedoch hatte die Einnahme von Pilocarpin weder Einfluss auf die Lebensqualität, noch brachte sie einen lindernden Effekt in Bezug auf die Schleimhautentzündung bei den Studienteilnehmern (Fisher et al., 2003). Darüber hinaus ist die Anwendbarkeit von Pilocarpin durch systemische Nebenwirkungen wie Bradykardie, Schweißausbruch, gastrointestinale Symptome und Bronchokonstriktion mit einhergehender Atemnot limitiert.

Amifostin ist ein phosphorylierter Aminothioalkohol, der als Zytoprotektivum eingesetzt wird. Es wird durch alkalische Phosphatase in freies Thiol umgewandelt und in gesunden Zellen eingelagert. Tumorzellen nehmen die Substanz wegen des sauren pH-Werts nur in geringen Mengen auf. Daher besteht keine Gefahr der Tumorprotektion (Koukourakis, 2003). Durch die Einlagerung von Amifostin werden die Zellen vor Strahlenschäden durch Abfangen freier Radikale und Bindung an zytotoxische Substanzen geschützt (DeNeve et al., 1988). In präklinischen Studien an Hunden, Mäusen und Affen wurde eine effektive chemo- und radioprotektive Wirkung nachgewiesen (Spencer et al., 1995). Die Arbeitsgruppe um Wassermann veröffentlichte die Ergebnisse einer Phase 3-Studie mit Patienten, die während der Bestrahlung mit Amifostin behandelt wurden. Bei diesen kam es zu einem verringerten Vorkommen von Mundtrockenheit und einer vermehrten Speichelproduktion (Wasserman et al., 2005). Daten der Arbeitsgruppe um Rades zeigten aber, dass 16 von 39 Patienten unter Amifostin schwere toxische Nebenwirkungen hatten (Rades et al., 2004). Auch wurde diskutiert, ob die protektive Wirkung von Amifostin in Bezug auf die Mundtrockenheit nicht mit einer Minderung der antikanzerogenen Wirkung der Strahlentherapie verbunden wäre (Andreassen et al., 2003). Amifostin ist der am meisten verwendete, chemische Radioprotektor. Eine neue Studie der Arbeitsgruppe

um Gu zeigt, dass Amifostin die Xerostomie, Dysphagie und Mundschleimhautentzündung reduziert und die Toxizität des Medikaments akzeptabel ist (Gu et al., 2014).

Zur Behandlung der Xerostomie werden viele Speichelersatzmittel angeboten, die die Begleiterscheinungen der Mundtrockenheit lindern sollen. Sie sind in Sprayform, als Gele und Mundspülungen und in Form von Zahnpasten und Kaugummis erhältlich. Meistens sind in diesen Produkten Zusätze von Salzen, Fluoriden, antimikrobielle Kohlenhydrate wie Lactoferrin, Lysozym, Lactoperoxidase oder Xylitol auf einer Basis von tierischen oder pflanzlichen Mucinen, Algenextrakten und Carboxymethylcellulose enthalten (Hahnel et al., 2009). Die Studie der Arbeitsgruppe um Kielbassa ergab, dass ein Zusatz von Calcium, Fluorid und Phosphaten die Remineralisierung der Zahnhartsubstanzen steigert (Kielbassa et al., 2001). Außerdem sollte der pH-Wert neutral sein, um eine Demineralisierung vorzubeugen (Smith et al., 2001). Patienten nahmen auf Mucin-basierende Speichelersatzmittel gut an (Vissink et al., 1983), im Vergleich dazu deutlich schlechter solche auf Basis von Carboxymethylcellulose. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Therapie der Patienten individuell angepasst werden sollte. Die Speichelersatzmittel helfen ein Mindestmaß an Lebensqualität zu erhalten (Hahnel et al., 2009).

1.4.2 Operative und strahlentherapeutische Verfahren

Die Arbeitsgruppe um Jha beschrieb erstmals im Jahr 2000 die Möglichkeit des operativen Transfers der Unterkieferspeicheldrüse in die Submentalregion, um die Drüse außerhalb des Strahlenfeldes zu platzieren (Jha et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um Saibishkumar kombinierte diese Methode mit der intensitätsmodulierten Radiotherapie IMRT (Saibishkumar et al., 2007) und erreichte so eine Reduzierung der kumulativen Strahlendosis auf 25 Gy in der Ohrspeicheldrüse und 23 Gy in der Glandula submandibularis. Es gilt für mehrere Arbeitsgruppen wie Amosson und Eisbruch als unabdingbar, die kumulative Strahlendosis auf unter 24-26 Gy zu reduzieren, um den Speichelfluss nach Strahlentherapie zu erhalten (Amosson et al., 2003; Eisbruch et al., 2001). Mehrere Studien belegen, dass die Anwendung einer IMRT, welche die Ohrspeicheldrüse aus dem geplanten Zielvolumen hält bzw. die kumulative Strahlendosis in der Drüse auf unter 20 Gy reduziert, einen positiven Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten in Bezug auf die Mundtrockenheit hat (Jabbari et al., 2005; Parliament et al., 2004). Jedoch ist auf Grund der Lage des Tumors eine IMRT unter Schonung der Speicheldrüsen für eine Vielzahl der Patienten

nicht anwendbar. Obwohl die Methode nach Jha einen Ansatz bietet, die Schädigung des Speicheldrüsengewebes durch eine Bestrahlung zu reduzieren, ist sie doch auf bestimmte Tumorlokalisationen beschränkt und kann nicht bei allen Tumoren im Hals-Nasen-Ohren-Gebiet eingesetzt werden.

Ein weiterer operativer Ansatz wurde von der Arbeitsgruppe Spiegel beschrieben, die die erfolgreiche, mikrovaskuläre Transplantation der Unterkieferspeicheldrüse in die Leistenregion einer Ratte durchführte (Spiegel et al., 2000). Zweck dieser operativen Verlagerung der Drüse war es, die Drüse für den Zeitpunkt der Bestrahlung der schädigenden Strahlung zu entziehen und sie in einem weiteren operativen Schritt anschließend wieder an den Entnahmeort zu reimplantieren (Spiegel et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Hagen beschrieb die erfolgreiche Autotransplantation einer Glandula submandibularis beim Menschen. Hierbei wurde in einem zweiseitigen Verfahren zuerst eine Unterkieferspeicheldrüse in den Unterarm des Patienten verpflanzt, um diese vor der am Hals applizierten Bestrahlung zu schützen. In einem weiteren Schritt wurde nach erfolgter Bestrahlung die Drüse wieder im Bereich des Mundbodens replantiert. Erste Ergebnisse dieser Studie zeigen einen möglichen positiven Effekt auf die postradiogene Xerostomie (Hagen et al., 2015).

1.4.3 Genterapeutische Regenerationsstrategien

Die Arbeitsgruppe um Delporte versuchte mit Hilfe genterapeutischer Methoden die Xerostomie nach Strahlentherapie zu behandeln. Dafür wurde ein adenoviraler Vektor mit dem Gen des Wasserkanalproteins Aquaporin 1 versehen und die bestrahlten Glandulae submandibulares von Ratten transfiziert (Delporte et al., 1998). Die Speicheldrüsen zeigten hierauf eine Normalisierung der Speichelproduktion im Vergleich zur Kontrolle. Die Arbeitsgruppe um Cotrim brachte ein Gen für einen Wachstumsfaktor des Gefäßendothels (vascular endothelial growth factor, VEGF) oder ein Gen für einen Wachstumsfaktor für Fibroblasten (fibroblast growth factor, FGF) über einen adenoviralen Vektor in die Glandula submandibulares 48 h vor einer Bestrahlung von Mäusen ein. Auf diese Weise konnte eine deutliche Verbesserung der Speichelproduktion nach Strahlentherapie erreicht werden (Cotrim et al., 2007). Vorteile der adenoviralen Transfektion sind die vergleichsweise einfache Konstruktion und Herstellung der adenoviralen Vektoren, die Aufnahmefähigkeit für transgene Konstrukte und die Möglichkeit, sowohl sich teilende als auch nicht-teilende Zellen mit großer Effizienz zu transfizieren. Wesentlicher Nachteil dieser Methode ist eine mangelnde, dauerhafte Integration in das Genom der Zelle. Zudem führen wiederholte

Injektionen adenoviraler Vektoren zu einer unerwünschten Immunreaktion. Somit ist diese Methode für eine dauerhafte Regeneration ungeeignet.

1.4.4 Regeneration durch Stammzellen

Einen weiteren Lösungsweg, die Regeneration radiogen geschädigter Speicheldrüsenzellen zu fördern, stellt die Stammzelltherapie dar. Die Arbeitsgruppe um Rotter beschäftigte sich mit der Differenzierung von Stammzellen der Ohrspeicheldrüse zu Azinuszellen (Rotter et al., 2010). Es wurde untersucht, ob auf diesem Weg funktionelles Speicheldrüsengewebe regeneriert werden kann. Die Arbeitsgruppe um Lin zeigte durch ihre Arbeit die Induktion der Transdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Azinuszellen *in vitro* durch eine Kokultur mit Azinuszellen (Lin et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Lombaert beschrieb, dass die durch die Gabe des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) ausgelöste Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark eine Möglichkeit darstellt, die Funktion bestrahlter Speicheldrüsen von Ratten in Bezug auf die Produktion von Speichel positiv zu beeinflussen (Lombaert et al., 2006). Jedoch beruht der beschriebene Effekt weder auf einer Transdifferenzierung von Stammzellen zu Azinuszellen noch auf einem direkten Effekt von G-CSF auf die Speicheldrüsenzellen. Die beobachtete Verbesserung des Speichelflusses erfolgt vermutlich auf Grund einer zytokinmedierten Signalkaskade mit gewebsspezifischen Stammzellen.

1.4.5 Alternative Verfahren

Die Arbeitsgruppe um Wong führte Untersuchungen zur Wirkung der Akupunktur bei postradiogener Mundtrockenheit durch und konnten einen positiven Effekt auf diese beschreiben (Wong et al., 2003). Auch die Arbeitsgruppen von Johnstone und Blom beschrieben eine positive Wirkung der Akupunktur auf die postradiogene Mundtrockenheit und zeigten somit für die Zukunft weitere Therapieoptionen auf (Johnstone et al., 2001), (Blom et al., 1996).

1.5 Organersatz durch Tissue Engineering

Die Gewebezüchtung, Tissue Engineering, wurde von der Nationalen Wissenschaftsstiftung (National Science Foundation, NSF) 1988 wie folgt definiert: "Das Tissue Engineering ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden der technischen Entwicklung und der Biowissenschaften zum Zweck eines besseren

Verständnisses der Beziehungen von Struktur und Funktion in gesunden und pathologisch veränderten Geweben und die Entwicklung eines biologischen Ersatzes zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion.“ Es entstand aus dem Wunsch heraus, Organe außerhalb des menschlichen und tierischen Organismus heranzuzüchten und als Transplantat im menschlichen Organismus zu verwenden. Die Differenz zwischen verfügbaren Spenderorganen und Patienten, die auf ein Transplantat warten, dehnt sich für die meisten Organe weiter aus (Kim et al., 2014). So bietet das Tissue Engineering die Möglichkeit, in der Zukunft menschliches Gewebe zu züchten und in den Organismus als Ersatz zu implantieren.

Es zeigt auch neue Wege auf, Tierversuche drastisch zu reduzieren. Ein Beispiel dafür bietet das Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB in Stuttgart. Dort werden 3-D-Hautäquivalente als Testsysteme generiert, die physiologisch mit der natürlichen Haut vergleichbar sind. Sie bestehen aus humanen, primären Keratinozyten auf einem Kollagensubstrat, das humane, dermale Fibroblasten enthält. Da es sich um humane Zellen handelt, lassen sich aus diesen oft aussagekräftigere Ergebnisse ableiten als aus dem Tiermodell. Wegen der physiologischen Ähnlichkeit zur natürlichen Haut können diese 3-D-Hautäquivalente für *in vitro* Toxizitätstests von Substanzen, zum Studium der Wundheilung, Melanomforschung und zur Testung von *in vitro* Infektionen herangezogen werden. So werden sie auch für Hersteller von Pharmazeutika, Chemikalien und Kosmetika interessant (Mertsching et al., 2008).

Für die Generierung einer artifiziellen Speicheldrüse mit den Mitteln des Tissue Engineerings sind bereits einige grundlegende Hürden genommen worden. Zum einen ist es möglich, Speicheldrüsenzellen zu isolieren und zu vermehren. Die Arbeitsgruppe um Dardick zeigte an Gewebekulturen mit humanem Unterkiefer- und Ohrspeicheldrüsenngewebe, dass alle Zelltypen der Speicheldrüse, Azinuszellen, Gangepithelien und Myoepithelien, über einen Zeitraum von 28 Tagen unter Zusatz eines β -Sympathomimetikums sowohl erhalten als auch vermehrt werden können (Dardick et al., 1993). Zum anderen wurden bereits mehrere biokompatible Materialien getestet, auf denen Speicheldrüsenzellen wachsen und ihre Funktion und Morphologie beibehalten. Die Arbeitsgruppe um Bucheler besiedelte sogenannte Mikroträger (Microcarrier) mit humanen Parotiszellen (Bucheler et al., 2002). Ziel war es, autologe Speicheldrüsenorganoide für eine minimalinvasive Applikation, z. B. für die Injektion in die Mundschleimhaut bestrahlter Patienten herzustellen. Es gelang, die

gewebsspezifischen Differenzierungsmerkmale der Parotiszellen für 3 Wochen *in vitro* zu erhalten. Jedoch wiesen abfallende α -Amylasewerte auf eine Abnahme der sekretorischen Funktion der Azinuszellen *in vitro* hin.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Ansatz des Tissue Engineerings aufzuzeigen, um Patienten mit bestrahlungsinduzierter Xerostomie Therapieoptionen der Zukunft zu ermöglichen. Hierfür wurde zunächst eine Matrix für die Besiedelung mit humanen Parotiszellen gesucht. Humane Parotiszellen wurden kultiviert und auf ihre charakteristischen Eigenschaften untersucht. Des Weiteren wurde die porcine Glandula mandibularis nach einem neuen Dezellularisierungsprotokoll behandelt und die daraus entstandene Matrix charakterisiert. Es erfolgten verschiedene Besiedelungsversuche der Matrix mit humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen. Dabei ergaben sich folgende Fragen: Behalten die humanen Parotiszellen über mehrere Passagen in einer 2-dimensionalen Monokultur *in vitro* ihre charakteristischen Eigenschaften bei? Wie nehmen die humanen Parotiszellen die dezellularisierte, porcine Speicheldrüse als Matrix an? Wie ist die Vitalität und das Wachstumsverhalten der humanen Parotiszellen auf dem dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsegewebe zu beurteilen?

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung und Weiterverarbeitung der porcinen Glandula mandibularis

2.1.1 Gewinnung der porcinen Glandula mandibularis

Im Großtier-OP des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) des Universitätsklinikums Würzburg wurden 8 Wochen alte deutsche Landrasseschweine mit 18-25 kg Körpergewicht heparinisiert und durch die Verwendung des Anästhetikums Ketamin und dem Neuroleptikum Azaperon betäubt. Anschließend wurden sie mit dem Tötungsmittel T61, zusammengesetzt aus dem Narkotikum Embutramid, dem peripheren Muskelrelaxans Mebezoniumiodid und dem Lokalanästhetikum Tetracainhydrochlorid, für wissenschaftliche Zwecke euthanasiert. Alle Tiere erhielten in menschlicher Obhut die Versorgung nach den Anforderungen des Leitfadens für die Pflege und Verwendung von Labortieren, veröffentlicht vom Nationalen Gesundheitsinstitut, einer Behörde des Ministeriums für Gesundheitspflege und Soziale Dienste der Vereinigten Staaten von Amerika (National Institutes of Health, NIH, publication No. 85-23, 1996). Da es sich um Organentnahmen handelte, war kein Tierversuchsantrag notwendig. Die Operationen wurden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (§4 Absatz 3) durchgeführt und der verantwortliche Tierschutzbeauftragte informierte regelmäßig die zuständige Behörde. Die Operationen wurden unter der Aufsicht der Arbeitsgruppe von Dr. Marco Metzger ausgeführt. Die Köpfe wurden post mortem abgetrennt und die Glandula mandibularis entfernt. Es wurde dafür ein ca. 15 cm langer Schnitt durch Haut, subkutanes Gewebe und Platysma kaudal des Mandibularwinkels geführt, um die fibröse Kapsel der Glandula mandibularis freizulegen (Abbildung 1 A). Der Ductus mandibularis wurde durchtrennt und die freipräparierte Glandula mandibularis (Abbildung 1 B) in ein mit Phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline, PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) gefülltes 50 ml Falconröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) gegeben. Im Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg wurden die Speicheldrüsen dezellularisiert oder im Labor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg zur Kultivierung von porcinen Speicheldrüsenzellen verwendet.

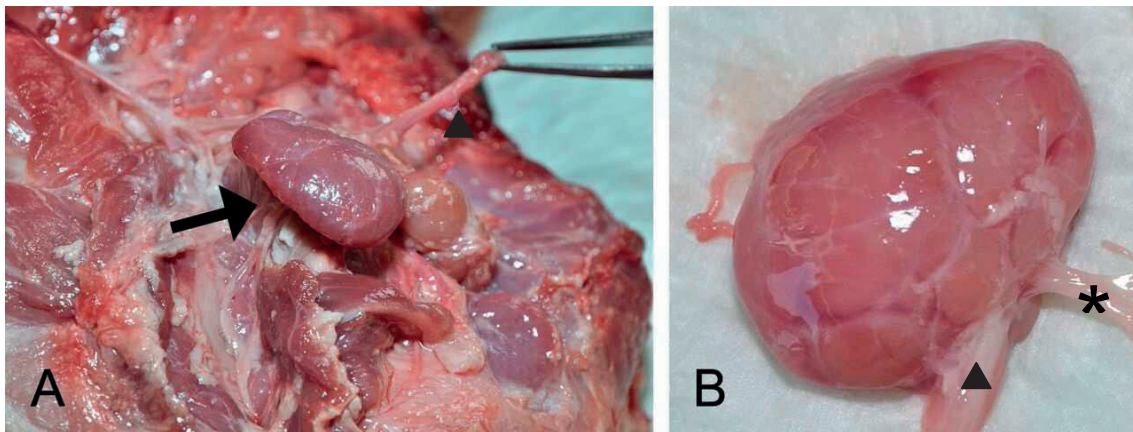


Abbildung 1 A: Freiliegende, porcine Glandula mandibularis, mit dem Schweinekopf noch verbunden. B: Freipräparierte, porcine Glandula mandibularis. Dargestellt ist die Glandula mandibularis (Pfeil), der Ductus mandibularis (Dreieck) und das Gefäßsystem (Stern).

2.1.2 Dezellularisierung der porcinen Glandula mandibularis

Die porcine Speicheldrüse wurde in ca. 1,5 cm³ kleine Gewebewürfel in einer Petrischale (Greiner Bio-One GmbH) unter sterilen Bedingungen mit einem Einmal-Skalpell (FEATHER Safety Razor CO., LTD., Osaka, Kinki, J) zerteilt. Diese wurden mit PBS mehrmals gewaschen. Die Stücke wurden in ein 50 ml Falconröhrchen mit Natriumdesoxycholat (sodium deoxycholate, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D), 42g gelöst in 2 l Reinstwasser (ultrapur water, Milipore, Schwalbach, D), gegeben und bei 4°C im Kühlraum auf dem Rotator SB3 Stuart® (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D) über Nacht gedreht. Es erfolgte eine 10-malige Waschung mit PBS über jeweils 30 min. Anschließend wurden die Speicheldrüsenstücke in Desoxyribonuklease I (DNase I, Roche Diagnostics, Mannheim, D) überführt und bei 4°C im Kühlraum über Nacht auf dem Wippschüttler (neoLab, Heidelberg, D) gelagert. Anschließend erfolgte eine mehrmalige Waschung mit PBS, versetzt mit einer 1%igen Penicillin-Streptomycin-Lösung (Biochrom GmbH, Berlin, D). Die vorbehandelten Speicheldrüsenstücke wurden zur Gammasterilisation in einer Transporttasche mit Kühllakkus über Nacht verschickt. Durch die Firma BBF Sterilisationservice GmbH in Rommelshausen erfolgte die Gammabestrahlung am nächsten Tag bei 25 kGy. Der Rücktransport fand am selben Abend statt. Nach der Bestrahlung erhielt man weißliche, dezellularisierte, porcine Speicheldrüsenstücke (Abbildung 2 A), die anschließend mit einem Einmal-Skalpell in ca. 0,5 cm³ kleine Stücke zurechtgeschnitten wurden (Abbildung 2 B).

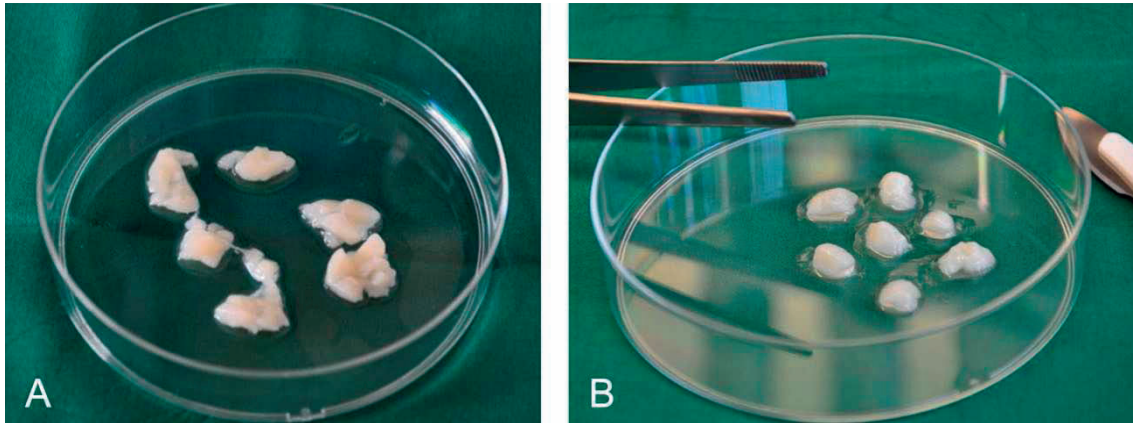


Abbildung 2 A: Dezellularisierte, ca. 1,5 cm³ kleine, porcine Speicheldrüsenstücke in einer Petrischale. B: Dezellularisierte, ca. 0,5 cm³ kleine, porcine Speicheldrüsenstücke für die Besiedelungsversuche.

2.2 Charakterisierung der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüse

2.2.1 Überprüfung des Dezellularisierungserfolgs durch die Feulgenfärbung

Zum Nachweis von Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde die histochemische Färbung von Feulgen und Rosenbeck durchgeführt (Feulgen et al. 1924). Als Gewebeprobe wurden Paraffinschnitte von dezellularisierter und nativer, porciner Speicheldrüse verwendet. Diese wurden entparaffiniert, dehydriert und anschließend in Leitungswasser gereinigt. Die Objektträger wurden 50 min in Salzsäure (HCl, 37%, 1M, VWR International GmbH, Darmstadt, D) getaucht. Die in der Gewebeprobe enthaltene DNA wurde durch die Salzsäure hydrolysiert. Dadurch wurden die Ribose-Purin-Bindungen in der DNA in Zucker und Aldehydreste gespalten. Der Objektträger wurde nach 2-maligem Spülen in Wasser für 60 min in der Feulgen-Farblösung (fuchsinschweflige Säure, Schiff's Reagenz, VWR International GmbH) inkubiert. Durch die Schiffsche Reaktion verband sich der Farbstoff mit den Aldehydresten. Die Objektträger wurden anschließend in eine vorbereitete Waschlösung mit Natriumdisulfit (Carl Roth GmbH) 2 x 3 min getaucht und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Carl Roth GmbH) dehydriert. Das Eindecken der Objektträger erfolgte mit Xylol (Xylenes®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

2.2.2 Messung des DNA-Gehalts von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse anhand des Quanti-iT™PicoGreen®ds DNA Assays

Um DNA-Reste nachzuweisen, die sich nach der Dezellularisierung möglicherweise in der porcinen Speicheldrüse befanden, wurde das Quanti-iT™PicoGreen®dsDNA

Assay Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D) verwendet. Als Material wurden drei dezellularisierte, porcine Speicheldrüsenstücke SD 1, 2 und 3 von drei verschiedenen Schweinen und als Positivkontrolle die drei nativen, porcinen Speicheldrüsenstücke SD 4, 5 und 6 verwendet. Ein ca. 2 cm³ großes, porcines Speicheldrüsenstück von jeder Glandula mandibularis wurde gefriergetrocknet, um bei der Auswertung keine Verfälschung durch die in der Drüse enthaltene Flüssigkeit zu erhalten. Von den gefriergetrockneten Speicheldrüsen wurden kleine Stücke zurechtgeschnitten, gewogen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Dneasy Blood and Tissue Kit Quiagen-Protokoll (Life Technologies GmbH). Das Gewebe wurde zerkleinert, in 10-15 mg schwere Stücke zerteilt und jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. 360 µl ATL-Puffer (Life Technologies GmbH) und 40 µl Proteinase K (Life Technologies GmbH) wurden hinzugegeben und gemischt. Das Gewebe wurde anschließend bei 56°C 10-12 h zur vollständigen Lyse inkubiert und bei 300 rpm (Umdrehungen pro Minute) im Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, D) geschüttelt. 400 µl AL-Puffer (Life Technologies GmbH) und 400 µl 100%iges Ethanol wurden hinzugegeben und gemischt. Das Gemisch wurde in eine Dneasy Mini-Spin-Säule (Dneasy Min spin Column, Life Technologies GmbH) pipettiert, welche in einem 2 ml Reaktionsgefäß platziert war. Die beladene Säule wurde für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und anschließend in ein frisches Sammelröhrchen (Collection tube, Life Technologies GmbH) gesetzt. Auf die Säule wurde 500 µl AW1-Puffer (Life Technologies GmbH) pipettiert und für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert, um die Säule zu waschen. Die Säule wurde auf ein frisches Sammelröhrchen gesetzt, der Vorgang mit 500 µl AW2-Puffer (Life Technologies GmbH) wiederholt und 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Die trockene Säule wurde auf ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt. 200 µl AE-Puffer (Life Technologies GmbH) wurden direkt auf die Membran pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 8.000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Die DNA-Messung erfolgte mit Hilfe der DNA-Messung von PicoGreen (ds DNA PicoGreen Assay, Life Technologies GmbH). Dafür wurde der TE-Puffer (Life Technologies GmbH) 1:20 mit H₂O verdünnt. Die High-Range Lambda-DNA Lösung (4 µg/ 2 ml) wurde 1:50 mit TE-Puffer gemischt (40 µl Lambda-DNA Stammlösung (= 100 µg/ml) + 1960 µl TE-Puffer). In Tabelle 1 ist die Herstellung der Standardreihe beschrieben.

Tabelle 1 Herstellung der Standardreihe der DNA-Messung des Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA Assays

Standard (Std)	Endkonzentration (ng/ml)	DNA-Stocklösung/ Verdünnung (µl)	1 x TE-Puffer (µl)	Gesamtvolumen (µl)
1	1000	2000	0	2000
		1600 (v. Std. 1)	400	2000
2	800			
		1500 (v. Std. 2)	500	2000
3	600			
		1667 (v. Std. 3)	333	2000
4	500			
		1600 (v. Std. 4)	400	2000
5	400			
		1500 (v. Std. 5)	500	2000
6	300			
		1333 (v. Std. 6)	667	2000
7	200			
		1000 (v. Std. 7)	1000	2000
8	100			
		200 (v. Std. 8)	1800	2000
9	10			
		200 (v. Std. 9)	1800	2000
10	1			2000
11	Leerwert	0	300	

Das Quanti-iT™ Pico Green® dsDNA Reagenz (Pico Green Reagenz, Life Technologies GmbH) wurde 1:200 mit TE-Puffer verdünnt. 100 µl der Standardreihe (Standard 1-11, Tabelle 1) und 100 µl der Proben in Duplikaten wurden jeweils in ein Well einer schwarzen 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH) pipettiert. Hinzugefügt wurden 100 µl des verdünnten Pico Green Reagenz in jedes Well, um die Endkonzentration zu erhalten. Die Proben wurden gemischt und 5 min lichtgeschützt

inkubiert. Über den Tecan Mikroplattenleser Infinite M200 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D) wurde die Fluoreszenz mit der Software Tecan i-control 1.7 (Tecan Deutschland GmbH) bei Anregung von 480 nm und Emission von 525 nm gemessen. Aus den ermittelten Fluoreszenzwerten der Standardreihe der DNA-Endkonzentrationen 0-1000 ng/ml wurde eine Messkurve erstellt (Abbildung 3). Die Berechnung des DNA-Gehalts erfolgte anschließend durch das Einsetzen der erhaltenen Fluoreszenzmesswerte der Proben in die Geradengleichung (Formel $y(\text{nm})=46,131x(\text{ng/ml})+2291,9$) der Messkurve, die mit Hilfe des Excel-Programmes (Microsoft 2010) erstellt wurde. Die Werte der Messkurve sind der Tabelle 32 in Kapitel 6.2.3 zu entnehmen. Der DNA-Gehalt wurde in ng/mg angegeben.

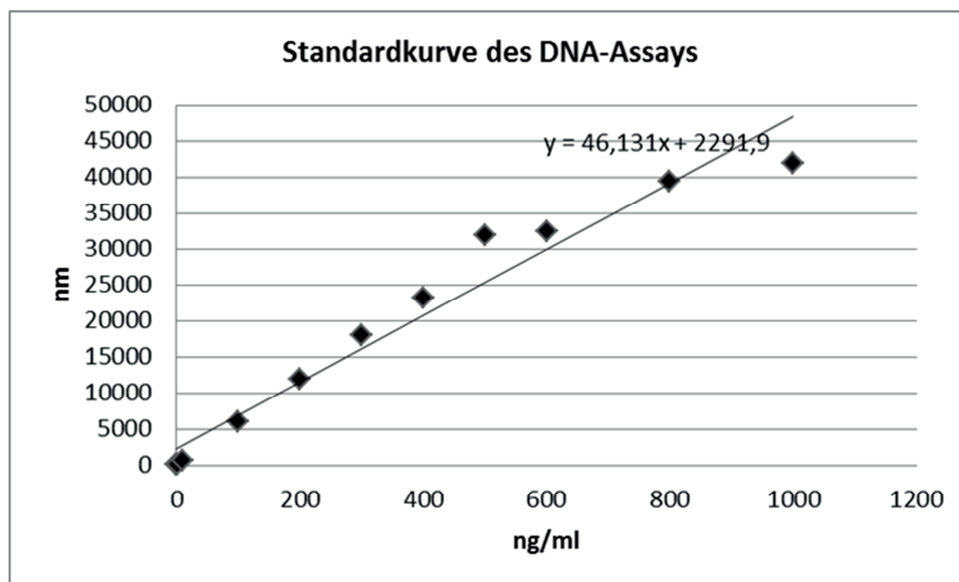


Abbildung 3 Messkurve der Standardreihe zur Auswertung des DNA-Gehalts einzelner Proben in ng/ml.

2.2.3 Messung des Elastingehalts von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse anhand des Fastin™ Elastin Assays

Der Fastin™ Elastin Assay (Biocolor life science assays, Carrickfergus, Antrim, UK) wurde angewandt, um den Elastingehalt von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse zu bestimmen. Es wurden 10-15 mg schwere Speicheldrüsen-stücke von jeweils 3 dezellularisierten Speicheldrüsen SD 1, 2, 3 und von 3 nativen Speicheldrüsen SD 4, 5, 6 unterschiedlicher Schweine verwendet. Die Gewebestücke wurden gefriergetrocknet und jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Verdauung der Proben wurde 750 µl 0,25 M Oxalsäure (Biocolor life science assays) zugegeben und die Reaktionsgefäße im vorgeheizten Thermostat (Eppendorf AG) für 60 min bei 100°C inkubiert. Anschließend ließ man die Proben abkühlen und bei

10.000 rpm 10 min zentrifugieren. Bei Bildung eines Sediments wurde der Überstand abgenommen und der Rest ein zweites Mal verdaut. Für die Durchführung des Fastin™ Elastin Assays wurde die Standardreihe (Biocolor life science assays) in Duplikaten angesetzt. Für die Standardreihe wurden 100 µl, die 6, 12,5, 25, 50 oder 75 µl α-Elastin enthielten und mit deionisiertem Wasser aufgefüllt wurden, in je ein Reaktionsgefäß pipettiert. Als Leerwert wurde 100 µl des entionisierten Wassers verwendet. Von den Proben wurden nach dem Oxalverdau je 100 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert und Duplikate angesetzt. 100 µl von 4°C kaltem Elastin-Präzipitationsreagenz (elastin precipitating reagent, Biocolor life science assays) gab man in jedes Reaktionsgefäß hinzu. Nach kurzem Mischen inkubierte man die Reaktionsgefäße 15 min bei Raumtemperatur, um eine vollständige Präzipitation des α-Elastins zu erwirken. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 12.000 rpm wurde der Überstand abgeschüttet. Nach Zugabe von 1 ml Fastin-Farbstoffreagenz (fastin dye reagent, Biocolor life science assays) pro Reaktionsgefäß wurden die Proben gemischt und 90 min auf dem Rotator SB3 Stuart® vermischt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der noch ungebundene Farbstoff (dye) abgeschüttet, 250 µl Farbstoff-Dissoziationsreagenz (dye dissociation reagent, Biocolor life science assays) zugegeben und gemischt. Nach 10 min wurden die Proben gemischt. 200 µl von den Proben SD 1, 2 und 3 wurde in 1 Well einer durchsichtigen 96-Well-Platte übertragen. Von den Proben SD 4, 5 und 6 wurden 100 µl in 1 Well gegeben und mit 100 µl entionisierten Wassers verdünnt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte auf der Wellenlänge von 513 nm am Tecan Mikroplattenleser Infinite M200 mit der Software i-Control der Tecan Group 8. Die Elastinkonzentration wurde mit Hilfe der Standardkurve durch Einsetzen des erhaltenen Fluoreszenzmesswertes der Proben in die Geradengleichung der Messkurve (Formel: $y(\text{nm})=0,0344x(\mu\text{g})+0,1745$) der Standardreihe (Abbildung 4) errechnet. Der Elastingehalt wurde in µg/mg Gewebe angegeben. Da die Proben SD 4, 5 und 6 verdünnt wurden, wurde ihr Ergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert. Die Werte der Messkurve der Standardreihe sind der Tabelle 33 in Kapitel 6.2.3 zu entnehmen.

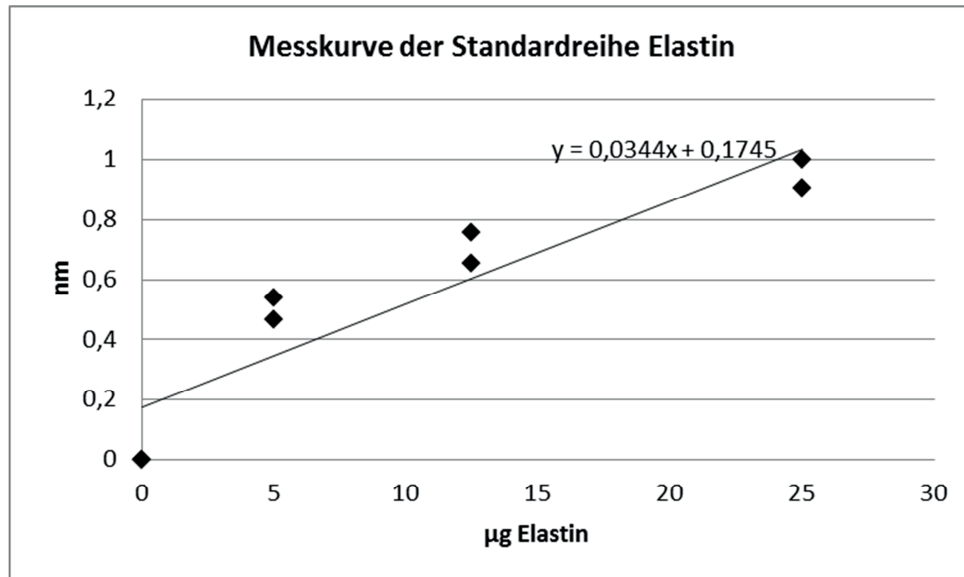


Abbildung 4 Messkurve der Standardreihe des Fastin™ Elastin Assays zur Bestimmung des Gesamtelastings in µg/mg.

2.2.4 Messung des Kollagengehalts von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse anhand des Sircol™ Soluble Collagen Assays

Um den Kollagengehalt von nativer und dezellularisierter, porciner Speicheldrüse zu bestimmen, wurde der Sircol™ Soluble Collagen Assay (Biocolor life science assays) angewandt. Es wurden 20-21 mg schwere Speicheldrüsenstücke von jeweils 3 dezellularisierten Speicheldrüsen SD 1, 2, 3 und 3 g schwere Speicheldrüsenstücke von nativen Speicheldrüsen SD 4, 5, 6 unterschiedlicher Schweine verwendet. Die Gewebestücke wurden gefriergetrocknet und jeweils in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Um das enthaltene Kollagen aus dem Gewebe herauszulösen, wurden 1 ml 0,5 M Essigsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), versetzt mit 0,1 mg/ml Pepsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden bei 4°C im Kühlraum auf dem Rotator SB3 Stuart® über Nacht inkubiert und anschließend 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das nicht gelöste Pellet wurde in 200 µl deionisiertem Wasser resuspendiert. Von dem gelösten Kollagen wurden 100 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Für die Standardreihe wurden 100 µl, die 5, 10, 15, 30 oder 50 µl Kollagen enthielten und mit deionisiertem Wasser aufgefüllt wurden, in je ein Reaktionsgefäß pipettiert. Als Leerwert wurde 100 µl des entionisierten Wassers verwendet. Von jeder Probe wurden Duplikate hergestellt. In jedes Reaktionsgefäß wurde 1 ml des Sircol-Farbstoffreagenz (sircol dye reagent, Biocolor life science assays) hinzugefügt und 30 min auf dem Rotator SB3 Stuart® bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bildete sich zwischen dem Farbstoff

und dem Kollagen ein Komplex. Der ungebundene Farbstoff blieb gelöst. Die Proben wurden bei 12.000 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 750 µl eiskaltem Säuresalz-Waschreagenz (acid-salt wash reagent, Biocolor life science assays) gewaschen und bei 12.000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. 250 µl des Alkali-Reagenz (alkali reagent, Biocolor life science assays) wurde zugegeben und die Proben gemischt. Das gebundene Kollagen wurde dadurch innerhalb von 5 min wieder freigesetzt und der Farbstoff gelöst. 200 µl von jeder Probe wurden in eine Vertiefung einer durchsichtigen 96-Well-Platte gegeben. Die Fluoreszenzmessung erfolgte auf der Wellenlänge bei 555 nm am Tecan Mikroplattenleser Infinite M200 mit der Software i-Control. Die Kollagenkonzentration wurde mit Hilfe der Standardkurve durch Einsetzen des erhaltenen Fluoreszenzmesswertes der Proben in die Geradengleichung der Messkurve (Formel: $y(\text{nm})=0,0378(\mu\text{g})+0,0757$) der Standardreihe (Abbildung 5) ermittelt. Der Kollagengehalt wurde in µg/mg Gewebe angegeben. Der Tabelle 34 in Kapitel 6.2.3 sind die Werte der Messkurve zu entnehmen.

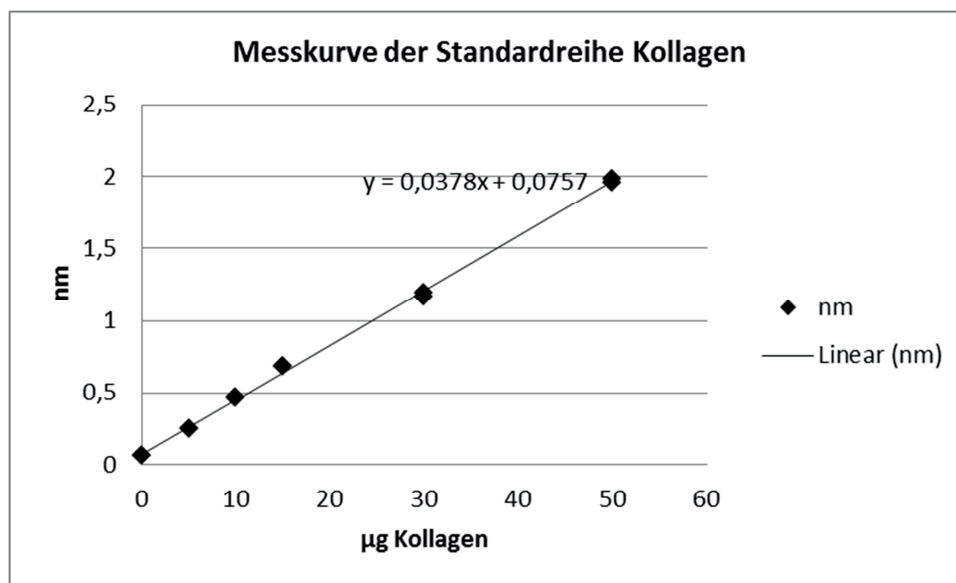


Abbildung 5 Messkurve der Standardreihe des Sircol™ Soluble Collagen Assays zur Bestimmung des Gesamtkollagengehalts in µg/mg.

2.2.5 Gallensäuretestung anhand des Total Bile Acids Assay Kits

Die Dezellularisierungslösung besteht aus Natriumdesoxycholatlösung, die Desoxycholsäure, eine sekundäre Gallensäure, beinhaltet. Die dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke wurden nach dem Dezellularisierungsprozess zwar mit PBS gut gewaschen. Doch sollte mit dem Gallensäuretest mögliche Reste von Desoxycholsäure nachgewiesen werden, da diese Auswirkungen auf die Re-

Besiedelung der Matrices haben kann. Bei diesem Test wurde das Total Bile Acids Assay Kit (Diazyme Laboratories, Gregg Court Poway, CA, USA) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Umwandlung von Gallensäuren in oxidierte Gallensäuren durch das Enzym 3- α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3- α -HSD) in Gegenwart der oxidierten Form von Thio-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Thio-NAD), was sich in die reduzierte Form Thio-NADH umwandelt (Abbildung 6). Dabei wird eine Farbreaktion von hellgelb nach dunkelgelb sichtbar. Die Untersuchung erfolgt spektrophotometrisch am Tecan Mikroplattenleser Infinite M200.

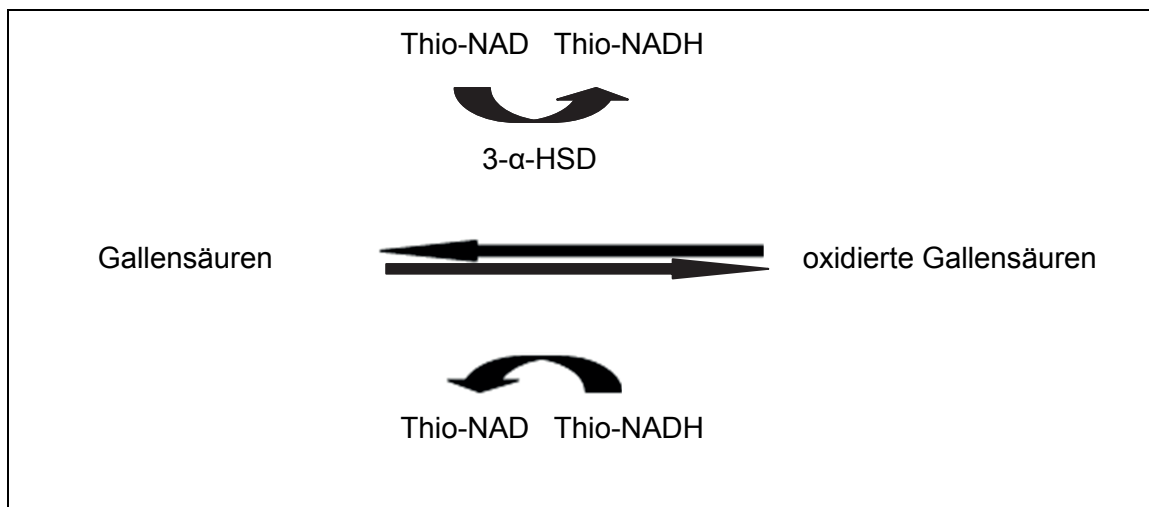


Abbildung 6 Schema der Umwandlung von Gallensäure.

Zusammensetzung der Reagenzien (Diazyme Laboratories):

R1 = Thio-NAD-Lösung

R2 = 3- α -HSD-Lösung

Gallensäure-Kalibrator = Konjugierte Cholsäuren, Puffer

Der PBS-Überstand, in der man die dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke nach der Gammasterilisation bei 4°C aufbewahrte, wurde abpipettiert und auf restliche Desoxycholsäure untersucht. Man verwendete die Proben Überstand 1 und Überstand 2 (ÜS 1 und ÜS 2) von zwei dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücken. Die Blindprobe bestand aus reiner PBS-Lösung. Die Positivkontrolle enthielt Natriumdesoxychololat (ND, 1:50 verdünnt in 0,9% Natriumchlorid, NaCl, Carl Roth GmbH). Es wurde zur Kalibrierung ein Gallensäure-Kalibrator mit 0,9%iger NaCl, Carl Roth GmbH als Null-Referenz eingesetzt. Der Tecan Mikroplattenleser Infinite M200 wurde auf 37°C vortemperiert. Jede Probe wurde in eine Vertiefung einer schwarzen 96-Well-Platte pipettiert und 180 μ l von R1 hinzugegeben. Bei 37°C wurde diese nun für 3 min inkubiert und eine Leerwertmessung der Absorption bei 405 nm durchgeführt.

Nach der Messung pipettierte man 80 µl von R2 hinzu. Die Messungen erfolgten bei 0, 60 und 120 sec. Die Gesamtgallensäurekonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c \text{ (Konzentration)} = (\Delta \text{ (Probe)} - \Delta \text{ (Leerwert)}) / (\Delta \text{ (Kalibrator)} - \Delta \text{ (Leerwert)}) \times 50 \text{ } \mu\text{mol/L (Verdünnungsfaktor)}$$
$$\Delta \text{ Probe} = E_{\text{Probe}} \text{ nach 120 sec} - E_{\text{Probe}} \text{ nach 60 sec (E = Extinktion in nm)}$$
$$\Delta \text{ Kalibrator} = E_{\text{Kalibrator}} \text{ nach 120 sec} - E_{\text{Kalibrator}} \text{ nach 60 sec}$$
$$\Delta \text{ Leerwert} = E_{\text{Leerwert}} \text{ nach 120 sec} - E_{\text{Leerwert}} \text{ nach 60 sec}$$

2.3 Gewinnung und Kultivierung von primären Speicheldrüsenzellen

2.3.1 Operative Gewinnung von humanem Parotisgewebe

Speicheldrüsendgewebe-Spender waren 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 an gutartigen Speicheldrüsentumoren erkrankt waren und bei denen im Zeitraum von Mai 2013 bis Mai 2014 eine Teilresektion der Glandula parotidea durchgeführt wurde. Alle Teilnehmer wurden nach Vorgaben des Ethikkommissionsantrages des Universitätsklinikums Würzburg (Nr. 16/06) mündlich und schriftlich über die Verwendung ihres Gewebes im Sinne der Wissenschaft während der Untersuchung informiert.

2.3.2 Kultivierung von primären Speicheldrüsenzellen der Glandula parotidea und porcinen Speicheldrüsenzellen der Glandula mandibularis

Nach dem operativen Eingriff wurde das entfernte Parotisgewebe (Abbildung 7 A) in physiologische 0,9%ige NaCl überführt und unter laborhygienischen Maßgaben einer Sterilbank weiter verarbeitet. In einer Petrischale wurde mit einem Einmal-Skalpell das Gewebe der Glandula parotidea von Bindegewebe befreit und in 1 mm³ kleinen Gewebewürfel zerkleinert. Um mögliche bakterielle oder virale Kontaminationen auszuschließen, wurde das Gewebe während der Bearbeitung in Dulbecco's Modified Eagle's-Medium (DMEM, Gibco®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) mit 1% Fungizone (Amphotericin B, 250µg/ml, Gibco®, Invitrogen GmbH) und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung mehrmals gewaschen. Die einzelnen Gewebewürfel wurden in eine

Zellkulturplatte (24-Well-Platte, Greiner Bio-One GmbH) überführt, in der jeweils 250 ml Bronchial Epithel Growth-Medium (BEGM, PromoCell, Heidelberg, D) zuzüglich 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung zugegeben wurde (Abbildung 7 B). Die Kulturplatten wurden in einem Inkubator (CO₂ Incubator NU5500E, NuAire Inc., Plymouth, MA, USA) bei 37°C und 5% CO₂ (Kohlenstoffdioxid) inkubiert. Um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde jeden zweiten Tag das Medium gewechselt. Das Kultivieren von porcinen Speicheldrüsenzellen erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

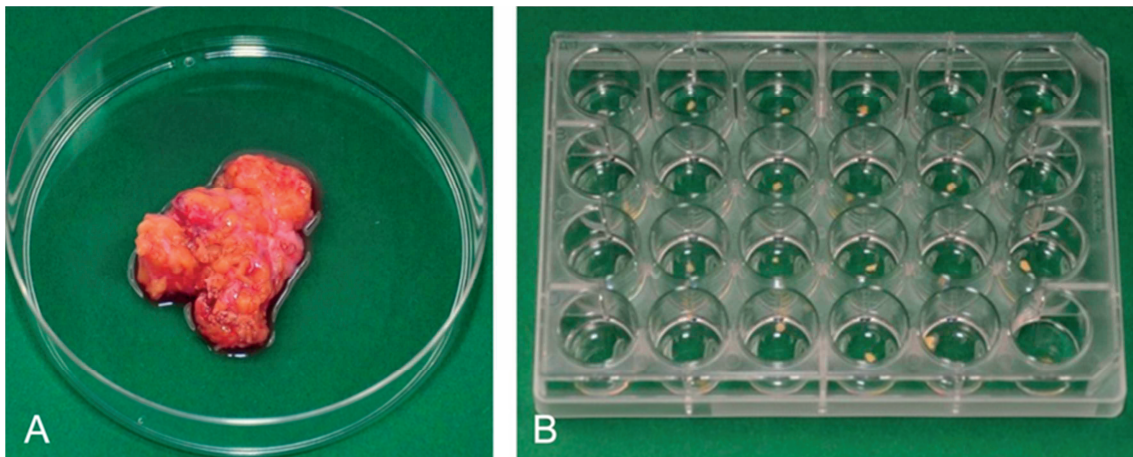


Abbildung 7 A: Natives, humanes Parotisgewebe *ex vivo*. B: 24-Well-Platte mit 1 mm³ kleinen, humanen Parotisstücken.

2.3.3 Passagieren und Zählung der Zellen unter Verwendung des Trypanblau-Vitalitätstests

Nach ca. 7-10 Tagen ließen sich einzelne, primäre, adhärenente Zellen rund um die kleinen Gewebestückchen erkennen. Nach 10-14 Tagen Wachstum war ein Zellrasen mit einer Konfluenz bis zu 100% sichtbar. Das Nährmedium wurde abgesaugt und der Zellrasen anschließend mit 250 ml 2,5%igem Trypsin-EDTA (Gibco®, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D) bedeckt, um die Zellen von der Bodenplatte abzulösen. Die Proteine außerhalb der Zellen wurden aufgespalten. Dadurch verloren die Zellen die Haftung vom Untergrund. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle (Lichtmikroskop 473028, Zeiss, Oberkochen, D) der Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturplatte. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMIM, Biochrom GmbH, Berlin), welches fetales Kälberserum (FCS, fetal calf serum, Linaris, Wertheim-Bettingen, D) enthielt, abgestoppt. Die entstandene Suspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) gegeben und 5 min bei 1100 rpm

zentrifugiert. Dadurch kam es zur Trennung der flüssigen und festen Bestandteile der Suspension. Der Überstand wurde abgesaugt. Das weißliche, kegelförmige Sediment am Boden des Röhrchens, bestehend aus Zellen, wurde in BEGM mit 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung resuspendiert.

Die Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D) unter Verwendung des Trypanblauausschlusstests. Die Neubauer-Zählkammer ist in vier Großquadrate mit je 16 Kleinquadranten unterteilt. 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurde in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Alle Zellen in den vier Quadranten wurden gezählt (Abbildung 8 A). Die Summe der gezählten Zellen wurde durch 4 dividiert und anschließend mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert. Das Ergebnis entsprach der Zahl an Zellen, die in einem Milliliter Medium vorhanden waren. Die Vitalität der humanen Parotiszellen wurde mit dem Trypanblau-Vitalitätstest nachgewiesen. Es wurden dafür 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gemischt und anschließend auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Der Farbstoff wurde von nekrotischen Zellen wegen der durchlässigen Zellmembran aufgenommen und färbte sie blau (Abbildung 8 B: Dreieck). In vitale Zellen drang er nicht ein. Daher erschienen diese unter dem Lichtmikroskop hell (Abbildung 8 B: Pfeil). Die Gesamtzellzahl sowie die Zahl der gefärbten Zellen wurde bestimmt und damit die Vitalität der getesteten Zellsuspension in Prozent errechnet.

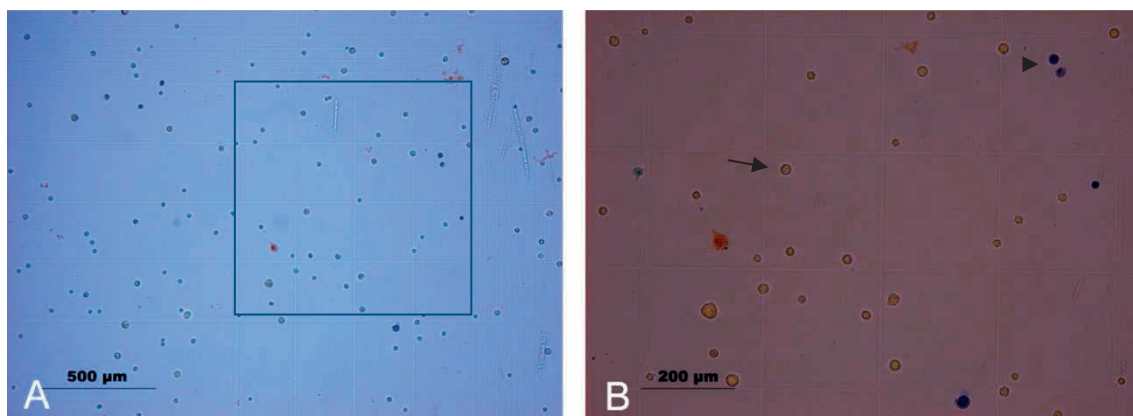


Abbildung 8 Humane Parotiszellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop, Färbung mit Trypanblau. A: Zählung der Zellen im Quadranten mit 16 Kleinquadranten. B: Dargestellt sind helle, vitale Zellen (Pfeil) und blaue, nekrotische Zellen (Dreieck).

Etwa 15.000 Zellen wurden ausgezählt und in 25 cm³ große Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) mit je 5 ml BEGM, 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung enthaltend, ausgesät. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Ab einer Konfluenz von ca. 80%

wurden die adhärennten Zellen zum zweiten Mal passagiert und in neue Zellkulturflaschen bis zur Größe von 175 mm³ überführt. Um genügend Zellen für die Besiedelung der Matrix zu gewinnen, wurden die humanen Parotiszellen bis Passage 3 kultiviert.

2.4 RNA-Isolierung von humanem Parotisgewebe und *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen

2.4.1 Grundlagen der RNA-Isolierung

Gene, die aktuell in einer Zelle transkribiert werden, liegen als Ribonukleinsäure (RNA) vor. Diese ist sehr anfällig für den Abbau durch Ribonukleasen (RNasen). Die Arbeitsflächen wurden gründlich gereinigt und Einweghandschuhe getragen, um Verfälschungen durch RNasen auf der Haut zu vermeiden. Die RNA-Isolierung wurde mit dem Quiagen-Rneasy Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden, D) ausgeführt. Das Gewebe wurde zunächst unter denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert. Durch die Zugabe von Lysispuffer, der Guanidinium Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol enthält, wurden RNasen inaktiviert. Diese Methode wurde von der Arbeitsgruppe um Chomczynski beschrieben (Chomczynski et al., 2006). Die RNA wurde von DNA, Zelltrümmern und Proteinen getrennt. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde nun mit Ethanol gemischt und in eine Rneasy MinElute Spin-Säule (Rneasy MinElute spin column, Quiagen GmbH) überführt, das die Fähigkeit der RNA nutzt, sich an eine Silicagel-Membran zu binden. In mehreren Waschschritten wurde die gebundene RNA nun gereinigt und durch Zugabe von RNase-freiem Wasser (Quiagen GmbH) aus der Membran wieder herausgelöst. Das Quiagen Rneasy Mini Kit wurde auch von anderen Arbeitsgruppen wie Wang zur RNA-Isolierung verwendet (Wang et al., 2006).

2.4.2 Durchführung der RNA-Isolation von humanem Parotisgewebe

Das humane Parotisgewebe wurde mit einem Einmal-Skalpell in ca. 100 mg schwere Stücke zerteilt und in ein Eppendorf Gefäß (Glaswaren Schott AG, Mainz, D) mit 1 ml RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) überführt, um die Ribonukleinsäure zu stabilisieren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Die Durchführung der RNA-Isolation erfolgte am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerativer Medizin des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor Frau Prof. Dr. Heike Walles).

Ein ca. 100 mg schweres Parotisstück wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) mit einer steril gebackenen Stahlkugel überführt. Zur Lysierung des Gewebes und zur Inaktivierung der RNasen gab man 600 µl Quiazol Lysis Reagenz (Quiagen GmbH) hinzu. Das Reaktionsgefäß wurde in den TissueLyser (Quiagen GmbH) gestellt und 3-5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden weitere 400 µl Quiazol Lysis Reagenz und 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gegeben. Es erfolgte ein 15 sec dauernder Mischvorgang. Das Reaktionsgefäß wurde 15 min auf Eis stehen gelassen und anschließend bei 15.000 rpm für mindestens 15 min bei 4°C mit der Eppendorf Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG) zentrifugiert. Es ergab sich dadurch eine Phasentrennung des Inhalts in eine wässrige Phase an der Oberfläche, bestehend aus RNA, eine Interphase aus DNA und eine organische Phase aus Zelltrümmern und Proteinen am Boden des Reaktionsgefäßes. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert, ohne die Interphase aufzuwirbeln, und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 70%igem Ethanol (Carl Roth GmbH) im Verhältnis 1:1 zur abgenommenen Phase wurden optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silicagel-Membran der Rneasy MinElute Spin-Säule geschaffen. Das Lysat wurde durch Verwirbelung gemischt. Davon wurden 700 µl in ein Rneasy MinElute Spin-Säule, platziert in einem 2 ml Sammelröhrchen (Quiagen GmbH), überführt und 1 min bei 10.000 rpm in der Eppendorf Zentrifuge 5424 (Eppendorf AG) zentrifugiert. Die RNA haftete sich an die Silicagel-Membran der Rneasy MinElute Spin-Säule an. Dadurch konnte in den nächsten Waschschrritten das Lysat im Sammelröhrchen verworfen werden. Der erste Waschschrtritt erfolgte mit 500 µl RPE-Puffer (Quiagen GmbH), der auf die Membran der Rneasy MinElute Spin-Säule gegeben wurde. Die Rneasy MinElute Spin-Säule wurde für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. 500 µl 80%igem Ethanol wurden hinzugegeben und 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Mit geöffnetem Säulchendeckel wurde die Rneasy MinElute Spin-Säule ein zweites Mal 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Inhalt wurde verworfen. Durch die Zugabe von 20 µl RNase-freiem H₂O (Quiagen GmbH) auf die Membran wurde durch 2-minütige Zentrifugation bei 14.680 rpm die RNA herausgelöst. Die in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangene RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.4.3 Durchführung der RNA-Isolation von *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen

Die humanen Parotiszellen wurden aus jeweils einem Parotisgewebstück von 3 Patienten gewonnen (siehe Kapitel 2.3) und über 3 Passagen kultiviert. Bei jeder Passage wurden ca. 5×10^5 Zellen gezählt, abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 350 μ l RLT-Puffer (Quiagen GmbH) überführt und durch 1-minütiges Mischen homogenisiert. Das Lysat wurde in eine Qiashredder Spin-Säule (Quiagen GmbH) überführt und 2 min bei 14.680 rpm zentrifugiert. 70%iges Ethanol wurde im Verhältnis 1:1 zu dem Lysat hinzugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat gemischt, anschließend in eine Rneasy MinElute Spin-Säule gegeben und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde samt Inhalt verworfen. Auf die Membran der Rneasy MinElute Spin-Säule wurde 350 μ l RW1-Puffer (Quiagen GmbH) gegeben, 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Sammelröhrchen samt Inhalt verworfen. Es wurde eine Mischung aus 10 μ l DNase I-Stock-Lösung und 70 μ l RDD-Puffer (Quiagen GmbH) hergestellt. Das Gemisch mit 80 μ l wurde auf die Membran der Rneasy MinElute Spin-Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. 350 μ l RW1-Puffer wurden hinzupipettiert und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Inhalt des Sammelröhrchens wurde verworfen. 500 μ l 80%igen Ethanol wurde auf die Membran der Rneasy MinElute Spin-Säule pipettiert und 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Rneasy MinElute Spin-Säule wurde in ein neues 2 ml Sammelröhrchen gestellt. Der Deckel wurde geöffnet und 5 min bei 14.680 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt des Sammelröhrchens verworfen. Zum Herauslösen der RNA aus der Membran der Rneasy MinElute Spin-Säule wurden 20 μ l RNase-freies H₂O auf die Membran gegeben und 1 min bei 14.680 rpm zentrifugiert. Die in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangene RNA konnte bis zur weiteren Bearbeitung bei -20° C gelagert werden.

2.4.4 Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben erfolgte mit Hilfe der Nanotrop-Messung. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit der Tecan Mikroplattenleser Infinite M200 verwendet. Zur Eluierung der RNA wurde auf die Messpunkte der Platte 2 μ l RNase-freies H₂O aufgetragen und die Referenzwerte berechnet. Danach trug man 2 μ l der RNA auf und ermittelte deren Konzentration. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der Software Tecan i-control 1.7.

2.5 cDNA-Synthese aus isolierter RNA

2.5.1 Grundlagen der cDNA-Synthese

Zur Durchführung der PCR benötigt man als Ausgangsmaterial komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA). Für den Startpunkt der cDNA-Synthese werden sogenannte Oligo-dT-Primer eingesetzt. Diese binden sich komplementär an die einsträngige RNA. Die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, lagert sich an den Primer an und katalysiert die Synthese des komplementären DNA-Stranges.

2.5.2 Durchführung der cDNA-Synthese

Die benötigten Reagenzien wurden aufgetaut und auf Eis pipettiert. Das iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad Laboratories GmbH, München, D) wurde verwendet. Für die Synthese der cDNA benötigte man 1 µl RNA, die durch die RNA-Isolierung in Kapitel 2.4 gewonnen wurde. Diese wurde in 15 µl RNase-freiem H₂O (BioRad Laboratories GmbH) in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) gelöst. Zu der Probe wurde 4 µl der iScript Reaktionsmischung (iScript Reaction Mix, BioRad Laboratories GmbH), bestehend aus 2 Primern, Nukleotiden, DNase-Puffer, Magnesiumphosphat (MgCl₂) und 1 µl der iScript Reverse Transkriptase, hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl. Die Synthese erfolgte im PCR Thermocycler von Sensoquest (Biorad Laboratories GmbH) nach dem vom Hersteller empfohlenen Temperaturschema. Zuerst wurde die RNA bei 25°C über 5 min denaturiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 30 min. Durch Erhitzen auf 85°C über 5 min wurde die cDNA-Synthese durch Denaturierung der Reversen Transkriptase gestoppt. Das Temperaturschema ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 PCR Thermocycler Temperaturschema von Sensoquest

Schritt	Temperatur °C	Zeit (in min)	Bemerkung
1	25	5	Denaturierung der RNA
2	42	30	cDNA-Synthese
3	85	5	Abstopfung der cDNA-Synthese

Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert oder sofort weiter bearbeitet.

2.6 Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion zur Funktionstestung der Primer α -Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5

2.6.1 Grundlagen der Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode, um kleine Teile von DNA zu vervielfältigen. Es werden ganze Gene oder Teile eines Gens repliziert. Die cDNA, die in den vorhergehenden Schritten gewonnen wurde, enthält den spezifischen DNA-Abschnitt (Template), der vervielfältigt werden soll. Es werden zwei Primer, bestehend aus einem Oligonukleotid, einer Taq-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), als Bausteine des neuen DNA-Strangs benötigt. Die PCR findet in einem Thermocycler statt, der die Reaktionsgefäße exakt auf die benötigte Temperatur kühlt und erhitzt.

Ein Zyklus besteht aus drei sich wiederholenden Reaktionsschritten. Zuerst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C. Durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den zwei DNA-Strängen werden diese voneinander getrennt. Durch die Abkühlung auf 61°C findet eine Anlagerung der Primer statt (Primer Annealing, Primerhybridisierung). Der dadurch entstandene Startpunkt für die Synthese des neuen Stranges (Promotor) dient der Taq-Polymerase dazu, Nukleotide anzulagern. Die Temperatur wird anschließend auf 72°C erhöht. Die Taq-Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers Nukleotide anzulagern (Elongation, Verlängerung). Am Ende eines Zyklus sind zwei DNA-Doppelstränge vorhanden, die im nächsten Zyklus als Vorlage für die Vervielfältigung dienen (Amplifikation). Der Stopp der Strangsynthese erfolgt beim nächsten Denaturierungsschnitt. Der Überhang, der beim ersten Schritt entsteht, ist in der nächsten Runde nicht mehr vorhanden, da sich die Primer an die DNA-Abschnitte anlagern, die am 5'-Ende schon richtig enden. Es werden 40 Zyklen wiederholt. Dadurch erhält man eine exponentielle Vervielfältigung der DNA, da die Produkte selbst auch als Matrize für weitere Strangsynthesen dienen.

2.6.2 Durchführung der Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion

Es wurden die Primer α -Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Tabelle 3) verwendet. Zur Erhaltung einer 1:20fachen Verdünnung der Primer mit einem Volumen von 100 pmol/ μ l wurde H₂O (Aqua, B. Braun, Melsungen, D) hinzupipettiert. Die Gradienten-PCR wurde zur Bestimmung der bevorzugten Temperatur der Primer durchgeführt.

Tabelle 3 Verwendete Primer der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH

Genname	α -Amylase	Cytokeratin 18	Aquaporin 5
Forward Primer	5'GAGGGGTTTCAGG TCTCTCCA3'	5'GAZCATCGAGGA CCTGAGGG3'	5'AACAACAACACAA CGCAGGG3'
Reverse Primer	5'TGTTCTGCACTC ACAGCAT3'	5'GGCCTTTTACTTC CTCTTCGTGG3'	5'AGTAGATTCCGA CAAGGTGGC3'
Produktlänge	221 bp	278 bp	169 bp

Zu jeder Probe wurde ein Mastermix für PCR-Lösungen (Bioline GmbH, Luckenwalde, D) hinzugegeben, dessen Bestandteile in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4 Mastermix für PCR-Lösungen

Lösungen	Menge
H ₂ O	18,7 μ l
5x Mango-Taq-Puffer	6 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
Primer forward	1 μ l
Primer reverse	1 μ l
Taq-Polymerase Bioline (5000U/ml)	0,3 μ l
Mastermix für 1 Probe	29 μ l

Die Negativkontrolle bestand aus dem Mastermix und 1 μ l Wasser. Die Positivkontrolle setzte sich aus dem Mastermix, dem Primer Elongationsfaktor 1-alpha (elongation factor 1-alpha/ EF1 α , Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) reverse + forward und 1 μ l cDNA zusammen. Die Probe zur Testung der Primer bestand aus dem Mastermix und dem Primer α -Amylase, Aquaporin 5 oder Cytokeratin 18 und 1 μ l cDNA.

Die Proben wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und im PCR Thermocycler von Sensoquest inkubiert. Die Annealingtemperatur betrug zwischen 51 und 61°C.

2.6.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung der Nukleotide

Nukleinsäuren sind negativ geladen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Gelelektrophorese zu Nutzen. Die Proben werden in ein polymerisiertes Gel gegeben, das unter elektrischer Spannung steht. Die DNA-Moleküle wandern zur Anode. Je größer das Fragment ist, desto langsamer ist die Wanderung. So trennt man die

Nukleinsäuren nach ihrer Basenpaarkapazität auf. Für die RNA-Auftrennung wurde dafür ein Agarosegel verwendet. Zur Herstellung eines großen Gels löste man 3,2 g eines 2%igen Agarosegelpulvers (Biozym Scientific, Oldendorf, D) in 160 ml TAE-Puffer (Tris-acetate buffer, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in einem Erlenmeyerkolben (Glaswaren Schott AG) auf. Die Lösung wurde 3 min bei 600 W in der Mikrowelle NN-E205W (Panasonic, Hamburg, D) erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. 8 µl Ethidiumbromid (EB, 1mg/ml, A. Hartenstein GmbH) wurden pro 100 ml hinzugegeben. Das heiße Gel wurde in einen Gelschlitten (PeqLab Biotechnology, Erlangen, D) gegossen und verfestigte sich nach ca. 30 min. 10 µl der Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Der sich in den Proben befindende Mango-Taq-Ladepuffer (Bioline GmbH) bewirkte das Absinken in die Geltaschen. Die Auftrennung der Nukleotide erfolgte in der Gelelektrophoresekammer (PeqLab Biotechnology) bei maximaler Spannung von >200 Volt und 180 mA Strom über ca. 100 min. Die Auswertung des Gels erfolgte durch die Bestrahlung mit UV-Licht im Transilluminator (Vilber Lourmat, Eberhardzell, D). Mit der Software Megacapt (Vilber Lourmat) konnte man die Banden darstellen.

2.7 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion zur Analyse der cDNA von *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen

2.7.1 Grundlagen der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Durch die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) werden bestimmte Abschnitte der DNA auf Grundlage des in Kapitel 2.7.1 beschriebenen PCR-Verfahrens vervielfältigt. Die Menge des entstandenen PCR-Produkts wird nach jedem PCR-Zyklus durch Fluoreszenzmessungen ermöglicht. Diese erfolgen über eine sequenzspezifische TaqMan-Sonde, die die Funktion eines Primers erfüllt. Sie ist an einem Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende mit einem Quencher-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Wenn die TaqMan-Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenz des Reporters durch die des Quenchers unterdrückt. Nach dem Beginn der PCR lagert sich die TaqMan-Sonde an einen komplementären DNA-Strang an. Es beginnt die Elongation durch die DNA-Polymerase. Diese besitzt zusätzlich eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und baut die TaqMan-Sonde am 5'-Ende ab. Dadurch wird die Fluoreszenz des Reporters freigesetzt und kann gemessen werden. Die Fluoreszenz ist proportional zu der vervielfältigten DNA. Zur Erstellung der Amplifikationskurve wird auf der y-Achse die gemessene Fluoreszenz und auf der x-Achse die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Man erkennt einen exponentiellen Anstieg der vervielfältigten

DNA. Um die vervielfältigte DNA quantitativ zu analysieren, wurde der errechnete Zyklus-Schwellenwert (cycle threshold, CT-Wert) verwendet. Dieser schneidet als horizontale Linie die Amplifikationskurve an dem Wert, an dem die Fluoreszenz sich vom Hintergrund abhebt und eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produkts einsetzt (Kück U. et al. 2004). Zur Ermittlung des CT-Werts verwendete man die Software des Analysegerätes Step-One™ Real-Time PCR (Life Technologies GmbH).

2.7.2 Durchführung der quantitativen Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Für die Analyse wurde die cDNA von humanen Parotiszellen dreier Patienten verwendet. Humanes Parotisgewebe stellte die Positivkontrolle dar. Als endogene Kontrolle wurde die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) und EF1 α als Primer verwendet. Zur Charakterisierung der humanen Parotiszellen wurden die Primer α -Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5 (Tabelle 3, Kapitel 2.6.2) eingesetzt. Für die Negativkontrolle wurde statt cDNA steriles, destilliertes H₂O (Aqua, B. Braun) pipettiert. Die cDNA wurde 1:10 und die Primer 1:25 mit H₂O verdünnt.

Für jede Probe wurde ein Mastermix in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt und anschließend in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Der Mastermix bestand aus 2 μ l Forward-Primer-Verdünnung, 2 μ l Reverse-Primer-Verdünnung, 5 μ l sterilem H₂O und 1 μ l cDNA (verdünnt) oder 1 μ l H₂O für die Negativkontrolle.

Zuletzt wurde 10 μ l des lichtempfindlichen Supermixes SsoFast™ EvaGreen (BioRad Laboratories GmbH), bestehend aus dNTPs, MgCl₂, DNA-Polymerasen und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, zu jeder Probe hinzupipettiert. Von jeder Probe wurden Duplikate erstellt. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt und in das Analysegerät gesetzt. Der Plattenbelegungsplan und das Protokoll wurden mit der Software Step-One™ Bio-Rad Real-Time-System (BioRad Laboratories GmbH) erstellt.

Die Proben wurden nach dem Protokoll von Tabelle 5 im Analysegerät inkubiert. Durch die Erhitzung der doppelsträngige DNA bei 95°C über 3 min wurde die DNA-Polymerase aktiviert. Die Denaturierung der DNA fand bei 95°C über 10 min statt. Nach einer Abkühlung auf 61°C in 30 sec lagerte sich der komplementäre Primer an die einzelsträngige DNA an. Bei 72°C fand die Elongation statt. Es wurden 40 RT-PCR Zyklen durchgeführt, wobei sich die Schritte 2-4 (Tabelle 5) wiederholten. Innerhalb

dieser Zyklen kam es zu einem exponentiellen DNA-Anstieg. Am Ende der Zyklen erfolgte eine Abkühlung auf 65°C. Zum Erreichen der Schmelzkurve wurde die Temperatur alle 5 sec um 0,5°C bis 95°C erhöht, wobei der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I freigesetzt wurde.

Tabelle 5 Inkubation der Proben im Analysegerät für die RT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	95°C	3 min	DNA-Polymerase-Aktivierung
2	95°C	10 min	Denaturierung
3	61°C	30 sec	Annealing-Temp.
4	72°C	30 min	Elongation
5	65°C	5 min	Abkühlung
6	95°C	5 min	Schmelzkurve

2.7.3 Analyse der relativen Genexpression

Für die Quantifizierung der DNA wurden die CT-Werte herangezogen. Es wurde die Stärke der Genexpression von α -Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5 in *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen von 3 Patienten über 3 Passagen nachgewiesen. Als Referenzgene wurden die Haushaltsgene GAPDH und EF1 α amplifiziert. Zur Normalisierung des DNA-Gehalts wurde die Differenz aus der Menge an Ziel-DNA (CT(Zielgen)) und der Menge des Referenzgens (CT(Referenzgen)) bestimmt.

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

Um die Genexpression des Zielgens auf zwei nichtregulierte Referenzgene zu beziehen, wurden zwei Haushaltsgene unter der folgenden Formel miteinbezogen:

$$CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{Referenzgen 1}) / CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{Referenzgen 2}) = \Delta CT_1 / \Delta CT_2$$

So wird die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert, da sämtliche Fehler innerhalb einer experimentellen Probe sowohl das Zielgen als auch die Referenzgene gleichermaßen betreffen. Um den relativen Genexpressionsunterschied einer Probe bezogen auf die Passage 1 zu ermitteln, wurde folgende Formel verwendet: $2^{-(\Delta CT_1 / \Delta CT_2)}$. Der sich errechnende Wert von Passage 1 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

2.8 Charakterisierung der humanen Parotiszellen durch Immunfluoreszenzdarstellung

2.8.1 Grundlagen der Immunfluoreszenzfärbung

Durch immunhistochemische Färbungen können Extrazellularmatrices, membranständige und gewebespezifische Proteine unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Es kann zusätzlich bestimmt werden, in welchem Gewebe und Kompartiment der Zelle ein Protein vorhanden ist. Werden die dazu verwendeten Antikörper (AK) mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, nennt man die Methode Immunfluoreszenzfärbung. In der vorliegenden Arbeit wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung angewendet. Dabei reagiert ein spezifischer, unkonjugierter Erstantikörper mit einem Antigen, das sich in den zu untersuchenden Zellen oder Gewebe befindet. An den Erstantikörper bindet der fluorochrommarkierte Zweitantikörper, der gegen die Wirtspezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Anschließend werden die behandelten Zellen oder Gewebeschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.8.2 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit Verwendung der Antikörper α -Amylase, Aquaporin 5 und Pan-Cytokeratin

Es wurde 10 Patienten Parotisgewebe entnommen (Kapitel 2.3.1) und eine 2-dimensionale Monokultur von humanen Parotiszellen über 3 Passagen kultiviert. Nach jedem Passagieren wurden die Zellen mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. 10.000 Zellen wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät und eine Nacht im Inkubator inkubiert. Dadurch konnten die humanen Parotiszellen auf dem Boden der Kulturplatte anhaften. Das Medium wurde am nächsten Tag abgesaugt und die Zellen 15 min mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA, AppliChem GmbH, Darmstadt, D) fixiert. Für die Antikörper α -Amylase, Aquaporin 5 und Pan-Cytokeratin (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, Tabelle 6) wurde eine 24-Well-Platte mit 10.000 Zellen verwendet. Als Positivkontrolle dienten Kryo-Gefrierschnitte von humanem Parotisgewebe. Als Negativkontrolle wurden Fibroblasten kultiviert, abgelöst, gezählt und jeweils 10.000 Zellen in eine 24-Well-Platte gegeben. Diese wurden nach dem gleichen Protokoll wie die humanen Parotiszellen behandelt. Durch 3-maliges Waschen mit PBS wurden die

Well-Platten von PFA gereinigt. Anschließend wurden die Zellen 20 min mit PBS, versetzt mit 0,1%igem Triton X (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 10%igem FCS bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen (Epitope) der Zellen zu blockieren. Durch das Triton X wurden die α -Amylase-, Pan-Cytokeratin- und Aquaporin 5-Antigene für den Antikörper erreichbar gemacht. Auf jedes Well wurde 200 μ l des verdünnten Erstantikörpers gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells durch 3-maliges Waschen mit PBS gereinigt. Die weiteren Schritte erfolgten in der Dunkelkammer. 200 μ l des verdünnten Zweitantikörpers (Tabelle 7) wurden in jedes Well gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dieser Einwirkzeit erfolgte eine einmalige Waschung der Wells mit PBS. Zur Darstellung der Zellkerne erfolgte eine 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung (DAPI Fluoromount-G™, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) der Zellen und Schnitte, wodurch die Zellkerne blau fluoreszierten. Der DAPI-Farbstoff wurde verdünnt und 200 μ l der Lösung 10 min auf die Wells gegeben. Die Wells wurden 3 malig mit H₂O gewaschen. Die Positivkontrolle der Gefrierschnitte erfolgte parallel nach dieser Färbemethode. Die Schnitte wurden davor mit einem Fettstift (PAP-Pen, Science Services GmbH, München, D) umrandet und anschließend in vierkammerige Kunststoffplatten (Quatriperm-Schale, Nalge Nunc International, New York, NY, USA) platziert. Am Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 4000B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D) fand die Auswertung statt. Von jedem Well wurden 5 übereinander projizierte Fluoreszenzbilder angefertigt, bestehend aus dem Fluoreszenzbild der DAPI-Färbung und dem der Immunfluoreszenzfärbung von α -Amylase-, Pan-Cytokeratin- oder Aquaporin 5. Die blau fluoreszierenden Zellkerne sowie die Zellen, die grün oder rot fluoreszierten, wurden auf jedem Bild ausgezählt. Dadurch konnte der Prozentanteil der α -Amylase-, Pan-Cytokeratin- oder Aquaporin 5-enthaltenden Zellen zu allen DAPI-gefärbten Zellkernen errechnet werden.

Tabelle 6 Erstantikörper

Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Hersteller
α -Amylase anti-rabbit	1:100	IgG	Biomeda, Burgwedel, D
Pan-Cytokeratin anti-rabbit	1:500	IgG	Dako Cytomation, Eching, D
Aquaporin 5 anti-mouse	1:400	IgG	Abcam, Milton, GB

Tabelle 7 **Zweitantikörper**

Antikörper	Verdünnung	Isotyp/ Färbung	Hersteller
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	1:400	IgG / grün	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor 555 anti-rabbit	1:400	IgG / rot	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor 647 anti-mouse	1:400	IgG / rot	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA

2.9 Besiedelung von dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücken

2.9.1 Allgemeines Besiedelungsprotokoll

Die Matrix aus dezellularisierter, porciner Speicheldrüse wurde in eine sterile Petrischale gelegt und mit einem Einmal-Skalpell in ca. 0,5 cm³ große Stücke zerteilt (Abbildung 2 B, Kapitel 2.1.2). Die zurechtgeschnittenen, unbesiedelten dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke (Matrices) wurden direkt vor dem Besiedelungsversuch 3 x für 2 min in einer Petrischale in PBS gewaschen und 10 min mit BEGM im Inkubator inkubiert. Vor jeder Besiedelung wurden die Matrices mit sterilen Tupfern abgetrocknet und jedes Stück in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben (Abbildung 9). Die für den Besiedelungsversuch vorgesehenen, porcinen und humanen Speicheldrüsenzellen der Passagen 1-3 (Kapitel 2.3) wurden kultiviert, abgelöst und gezählt. Für jeden Besiedelungsversuch wurden 7 Matrices angesetzt, auf die jeweils 10 µl Zellsuspension pipettiert wurde. Die nun besiedelten Konstrukte aus dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücken wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator zwischen 15 min und 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit BEGM aufgefüllt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Konstrukte nach 1–3 Wochen Inkubation histologisch und elektronenmikroskopisch ausgewertet.

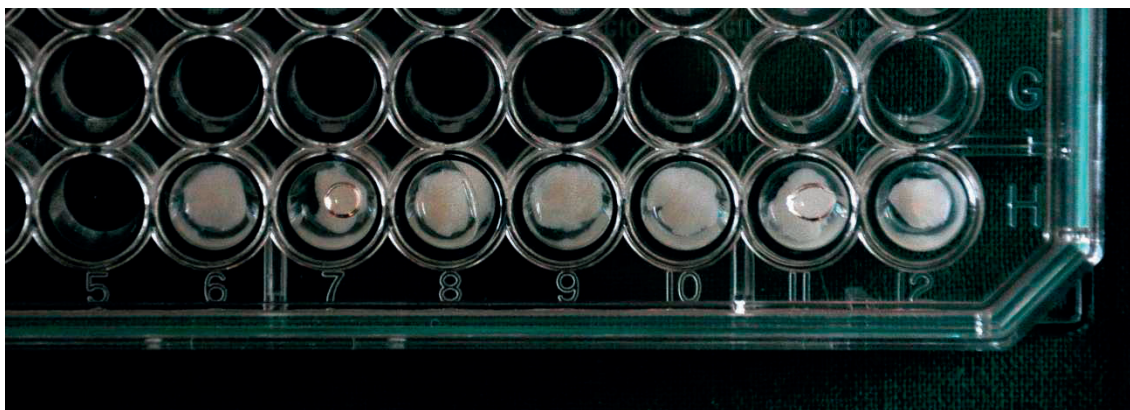


Abbildung 9 7 Konstrukte eines Besiedelungsversuches, platziert in einer 96-Well-Platte.

2.9.2 Besiedelungsversuche im Überblick

Um eine optimale Besiedelung der Speicheldrüsenzellen auf der Matrix zu erzielen, experimentierte man mit verschiedenen Variationsmöglichkeiten des Besiedelungsprotokolls.

Die Besiedelungsversuche sind in Tabelle 8 im Überblick dargestellt.

Tabelle 8 Besiedelungsversuche im Überblick

Versuch	Waschung in PBS	Zelltyp	Zellzahl	Inkubationszeit	Anzahl der Konstrukte	Behandlung der Matrixoberfläche
1	3 x über 2 min	humane SDZ	250.000	15 min	7 7	mit Fibrinkleber ohne Beschichtung
2	3 x über 2 min	humane SDZ	500.000	15 min	7 7	mit Fibrinkleber ohne Beschichtung
3	3 x über 2 min	humane SDZ	1.000.000	15 min	7 7	mit Fibrinkleber ohne Beschichtung
4	3 x über 2 min	porcine SDZ	250.000	15 min	7 7	mit Fibrinkleber ohne Beschichtung
5	3 x über 2 min	porcine SDZ	500.000	15 min	7 7	mit Fibrinkleber ohne Beschichtung
6	über 1 Woche	humane SDZ	500.000	120 min	7 7 7 7	Laminin/Fibronektin Kollagen Typ I Fibroblasten Fibrinkleber ohne Beschichtung

Versuch	Waschung in PBS	Zelltyp	Zellzahl	Inkubationszeit	Anzahl der Konstrukte	Behandlung der Matrixoberfläche
7	über 3 Wochen	humane SDZ	500.000	120 min	7 7 7	mit Hydrogel ohne Beschichtung ohne Beschichtung
8	über 3 Wochen	humane SDZ	1.000.000	120 min	7 7	mit Hydrogel ohne Beschichtung

*SDZ = Speicheldrüsenzellen

2.9.3 Pilotstudie: Besiedelungsversuche mit humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Fibrinkleber

Für die Besiedelungsversuche Nr. 1-5 (Tabelle 8, Kapitel 2.9.2) wurden die Matrices vor der Besiedelung 3 x über 2 min in PBS gewaschen. Auf die Matrices wurden unterschiedliche Zellzahlen von 250.00-1.000.000 humanen oder porcinen Speicheldrüsenzellen aufgetragen. Sie wurden für 15 min im Inkubator inkubiert, bevor man BEGM hinzupipettierte. Für jeden Versuch wurden 7 Matrices ohne und 7 Matrices mit dem Fibrinkleber Tissucol Duo S 1ml Immuno-Kit (Baxter, Unterschleißheim, D) behandelt, um die Adhäsion der Zellen auf der Matrix zu optimieren.

Der Fibrinkleber besteht aus einer tiefgefrorenen Kleberproteinlösung mit Aprotinin und einer tiefgefrorenen Thrombinlösung mit Kalziumchlorid. Werden die zwei Komponenten gemischt, verfestigen sie sich zum Fibrinkleber. Dieser wird als Gewebekleber, zur Blutstillung und Unterstützung der Wundheilung verwendet. Nach dem Auftauen wurden 5 µl der Thrombinlösung auf die Matrix pipettiert. Als zweiten Schritt wurde 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Kleberproteinlösung vermischt und auf die Matrix gegeben. Es kam zu einer sofortigen Reaktion der Kleberlösung mit der Thrombinlösung.

Vom Besiedelungsversuch Nr. 3 wurden jeweils 2 Konstrukte nach einer Woche der Besiedelung elektronenmikroskopisch untersucht. Die restlichen Konstrukte wurden histologisch untersucht.

2.9.4 Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Laminin/Fibronectin, Kollagen Typ I, Fibroblasten oder Fibrinkleber

Für den Besiedelungsversuch Nr. 6 (Tabelle 8, Kapitel 2.9.2) wurden die Matrices eine Woche vor der Besiedelung mit PBS zweitägig gewaschen, eine Nacht vor der Besiedelung zurechtgeschnitten und mit BEGM im Inkubator inkubiert. Die Inkubationszeit der Zellen auf der Matrix wurde von 15 min auf 2 h ausgedehnt. Um ein besseres Anhaften und späteres Einwachsen der Zellen zu gewährleisten, wurde in den Besiedelungsversuchen 6-8 die Bindegewebskapsel der Matrices abpräpariert. 7 Matrices wurden ohne Beschichtung besiedelt. Um die Adhärenz der humanen Parotiszellen auf der Matrix zu optimieren, wurden weitere Matrices vor der Besiedelung mit verschiedenen Substanzen oder Zellen vorbehandelt. Das Besiedelungsprotokoll ist der Tabelle 8 in Kapitel 2.9.2 zu entnehmen.

Die Beschichtung erfolgte mit Laminin und Fibronectin. Laminin ist Bestandteil der Basallamina und kommt in der extrazellulären Matrix (Extrazellulärmatrix, EZM) vor. Jedes Lamininmolekül, aus kollagenähnlichen Glykoproteinen bestehend, setzt sich aus einer α -, β - und γ -Proteinkette zusammen. Es fördert die Adhäsion, Differenzierung, Migration und das Wachstum von vielen Zellen. In diesem Versuch verwendete man 1%iges Laminin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), das von humanen Fibroblasten und Epithelzellen in einer Kokultur gebildet wurde. Fibronectin ist ein Glykoprotein der EZM, das für Zellmigration und -adhäsion eine wichtige Rolle spielt. Die Lösung für die Vorbehandlung der Matrices wurde mit 989 μ l PBS, 1 μ l 0,1%igem Fibronectin aus humanem Blutplasma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 10 μ l Laminin angemischt. Die Matrices wurden von der Lösung bedeckt und 2 h bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nach Abpipettierung der Lösung wurden 10 μ l Zellsuspension mit ca. 500.000 humanen Parotiszellen auf die Matrix gebracht und weitere 2 h im Inkubator inkubiert. Das weitere Vorgehen ist dem allgemeinen Besiedelungsprotokoll in Kapitel 2.9.1 zu entnehmen.

Kollagen ist ein sehr häufig vorkommendes Strukturprotein der EZM. Es ist vor allem in Bindegewebe und Haut vorhanden. Zum Beschichten der Matrices wurde das Kollagen Typ I (100 μ l/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verwendet. Die Matrices wurden mit der Lösung bedeckt, 1 h im Inkubator bei 37°C inkubiert und anschließend mehrmals in PBS gewaschen. 10 μ l Zellsuspension mit ca. 500.000 humanen Parotiszellen wurden

auf je eine Matrix gebracht, für 2 h im Inkubator inkubiert und anschließend mit BEGM aufgefüllt.

Fibroblasten spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese der EZM. Sie bilden Kollagen und Glykosaminoglykane. Um die Adhäsion der humanen Parotiszellen auf der Matrix durch die gebildeten Substanzen der Fibroblasten zu verbessern, wurde die Matrix zuerst mit Fibroblasten besiedelt. Dazu wurden die Fibroblasten in Kulturflaschen mit zweitägigem Mediumwechsel mit Fibroblast Medium CnT-05 (CELLnTEC, Bern, CH) kultiviert. Am Tag der Besiedelung wurden sie nach dem Protokoll der primären Speicheldrüsenzellen (Kapitel 2.3) abgelöst und gezählt. 40.000 Fibroblasten wurden in einer 10 µl Zellsuspension auf die Matrices gegeben und 1 h im Inkubator inkubiert. Das Nährmedium DMEM mit 10% FCS wurde hinzugegeben. Nach drei Tagen der Besiedelung wurde das Nährmedium abpipettiert und die Matrices mit 500.000 humanen Parotiszellen, gelöst in einer 10 µl Zellsuspension, besiedelt. Diese wurden vor Zugabe des Nährmediums BEGM 2 h im Inkubator inkubiert.

Ein weiterer Versuch wurde mit Fibrinkleber gestartet. Die Matrices wurden wie in Kapitel 2.9.4 vor der Besiedelung mit Fibrinkleber behandelt und nach dem Schema von Tabelle 8 in Kapitel 2.9.3 besiedelt.

Von jedem Beschichtungsversuch wurden von 7 Konstrukten nach einer Woche der Besiedelung jeweils 2 Konstrukte elektronenmikroskopisch und 5 Konstrukte histologisch untersucht.

2.9.5 Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Hydrogel

In den letzten Besiedelungsversuchen Nr. 7+8 wurden die Matrices bereits 3 Wochen vor der Besiedelung zurechtgeschnitten und alle 2-3 Tage mit PBS gewaschen. Eine Nacht vor der Besiedelung wurden die Matrices mit BEGM im Inkubator inkubiert. Aus Tabelle 8, Kapitel 2.9.2 ist das Besiedelungsprotokoll zu entnehmen.

In diesem Versuch wurde das HyStem® Hydrogel Trial Kit (Biotime Inc., Alameda, CA, USA) verwendet, das aus Gycosil® (Thiol-modifizierte Hyaluronsäure), Gelin™ (Thiol-modifiziertes Gelatin) und Extralink® (Polyethylenglycol Diacrylat) besteht. Hyaluronsäure ist ein wichtiger Teil des Bindegewebes und besteht aus Glykosaminoglykanen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Zellmigration. Das Gel bietet optimale Kulturbedingungen für verschiedene Zelltypen.

500.000-1.000.000 humane Parotiszellen wurden in einer 10 µl Zellsuspension pro Matrix aufgetragen. Als zweiten Schritt wurde das Hydrogel angemischt und 10 µl auf jedes Konstrukt pipettiert. Die Konstrukte wurden im Inkubator über 2 h inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.9.1.

Von den Besiedelungsversuchen Nr. 7+8 wurden nach einer Woche der Besiedelung jeweils 2 Konstrukte mit und ohne Hydrogel elektronenmikroskopisch und die restlichen Konstrukte nach 1-3 Wochen der Besiedelung histologisch untersucht.

2.10 Fluoreszenzfärbung der Konstrukte und der nicht-anhaftenden Zellen auf dem Wellboden

2.10.1 Vitalfärbung mit Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid

Eine weitere Möglichkeit, vitale Zellen von avitalen zu unterscheiden, ist die Vitalfärbung mit Fluoresceindiacetat (FDA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und EB. Es wurden 2,5 ml PBS mit 15 µl FDA und 30 µl EB frisch angesetzt und vermengt. Die Lösung wurde mit Aluminiumfolie (Carl Roth GmbH) vor Licht geschützt. Die humanen Parotiszellen wurden in eine 24-Well-Platte gegeben und mit der hergestellten Lösung bedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 4000B in einem abgedunkelten Raum. EB dringt in membrangeschädigte Zellen ein und färbt diese rot an. FDA hingegen wird in vitalen Zellen enzymatisch zu einem grün fluoreszierenden Metaboliten abgebaut. Für die Lebendfärbung mit FDA wurde ein blauer Lichtfilter mit 450-490 nm Wellenlänge, für die Totfärbung mit EB ein grüner Lichtfilter mit 520-560 nm Wellenlänge verwendet. Es wurden beide Aufnahmen übereinander projiziert. Man erhielt auf diese Weise eine Übersicht über das Verhältnis von vitalen zu avitalen Zellen (Abbildung 10).

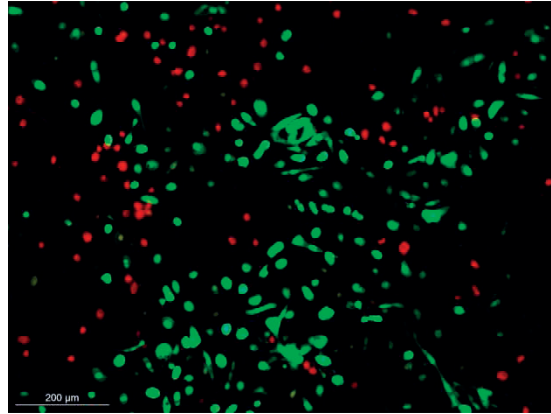


Abbildung 10 FDA/EB-Vitalfärbung: Humane Parotiszellen *in vitro* auf einer 24-Well-Platte. Dargestellt sind vitale, grün fluoreszierende Zellen und avitale, rot fluoreszierende Zellen.

Die Zellen, die nicht auf den Matrices anhafteten und sich nach zwei Tagen auf dem Wellboden angesammelt hatten, wurden mit dieser Methode auf ihre Vitalität untersucht. Jeweils ein Konstrukt aus Versuch Nr. 7+8 (Kapitel 2.9.5) wurde nach Tag 7, 14 und 21 auf eine Petrischale gelegt und mit FDA/EB angefärbt, um die Adhärenz und Vitalität der humanen Parotiszellen durch die Immunfluoreszenzfärbung auf der Matrix zu beurteilen.

2.10.2 DAPI-Färbung

Um die Zellkerne auf den Konstrukten im Fluoreszenzmikroskop darzustellen, wurden diese in Versuch 6 (Kapitel 2.9.) mit dem DAPI-Farbstoff angefärbt. Der DAPI-Farbstoff wurde 1:10.000 mit PBS verdünnt und 200 μ l der Lösung auf die Konstrukte gegeben. Die Auswertung erfolgte unmittelbar nach der Färbung am Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 4000B. Die Zellkerne fluoreszierten blau.

2.11 Herstellung von Kryo- und Paraffinschnitten

2.11.1 Kryokonservierung

Die Konstrukte wurden nach 7 und 21 Tagen Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aus der Wellplatte entnommen und in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 5 ml Rollrandgefäße (A. Hartenstein GmbH) für 4 h mit 4%igem PFA bei Zimmertemperatur auf dem Schüttler (IKA-Vibrax-VXR electronic, A. Hartenstein GmbH) fixiert. Dies führte zu einer irreversiblen Vernetzung der Proteine. Nach Absaugen der Flüssigkeit pipettierte man in die Rollrandgefäße 0,1 M Natriumphosphatpuffer (Merck KGaA, Darmstadt, D), um die Konstrukte von PFA zu reinigen. Nach 4 h erfolgte ein Wechsel des Puffers. Über Nacht wurden die Konstrukte auf dem Schüttler belassen. Die Konstrukte wurden in quadratische Vertiefungen, sog.

Tissue-Tek Kryoeinbettformen (tissue-tek cryomolds, 10 mm³, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NLD) überführt und mit Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe B.V.) bedeckt. Die Kryoeinbettformen wurden auf einen Eisblock gesetzt und auf -80°C gekühlt. Die Gefrierblöcke wurden bei -80°C im Gefrierschrank (Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, USA) gelagert.

2.11.2 Herstellung von Kryoschnitten

Die Gefrierschneidemaschine (Kryotom) Leica CM 1510 S (Leica Microsystems GmbH) wurde auf -25°C vorgekühlt. Die in Tissue-Tek eingefrorenen Konstrukte wurden auf einem metallischen Schneideblock angefroren. Es wurden 10 µm dünne Schnitte angefertigt. Auf einen Objektträger (Super-Frost Plus, R. Langenbrinck, Emmerdingen, D) wurden bis zu acht Gefrierschnitte aufgezogen, die nach 1 h Lufttrocknung angefärbt oder zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert wurden.

2.11.3 Paraffineinbettung

Die Konstrukte wurden nach 1-3 Wochen Inkubation in 4%igem PFA 1 h fixiert. Dadurch wurden die Präparate konserviert und gehärtet. Durch die Quervernetzung von Proteinen blieb so die ursprüngliche Zell- und Gewebemorphologie erhalten. Nach Waschung der Konstrukte in PBS wurden sie in Einbettkassetten (Klinipath, Duiven, NL) mit Filterpapier (Labonord, Mönchengladbach, D) überführt.

Die Paraffineinbettung der Konstrukte erfolgte in dem Einbettautomaten Mikrom STP120 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) nach folgendem automatisierten Programm (Tabelle 9).

Tabelle 9 Protokoll des Einbettautomaten zur Paraffineinbettung

Lösung	Zeit/h	Bemerkung
Leitungswasser	1	Auswaschen des Fixativs
Ethanol 50%	1	Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung
Ethanol 70%	1	
Ethanol 80%	1	
Ethanol 96%	1	
Isopropanol I	1	
Isopropanol II	1	
Isopropanol/Xylol (1:2)	1	Entfernen des Alkohols aus dem Gewebe
Xylol I	1	
Xylol II	1	
Paraffin I	1,5	Durchtränken des Gewebes mit Paraffin
Paraffin II	1,5	

Nach der Einbettung in Paraffin (Roti-Plast, Carl Roth GmbH) wurden die Konstrukte aus den Einbettkassetten entnommen. Am Paraffinspender (Leica Microsystems GmbH) wurden Edelstahlgießformen (24 x 37 x 9 mm, Labonord) mit heißem Flüssigkeitsparaffin gefüllt und die Konstrukte mit einer erwärmten Pinzette (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, D) in die Flüssigkeit getaucht. Mit dem beginnenden Aushärtungsprozess wurde der Boden der Einbettkassette auf die Ausgießform aufgesetzt und mit heißem Paraffin übergossen. Nach ca. 1-2 h waren die Blöcke in der Metallform bei Raumtemperatur ausgehärtet und konnten herausgelöst werden. Die Paraffinreste an der Blockhalterung wurden entfernt. Die Lagerung erfolgte bei Zimmertemperatur.

2.11.4 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden vor Einspannen auf einem Paraffinblock-Mikrotom RM 2255 (Leica Microsystems GmbH) auf einer Kühlplatte (Leica Microsystems GmbH) heruntergekühlt. Nach Antrimmen des Paraffinblocks wurde die Schnittdicke auf 7 µm eingestellt. Der Paraffinblock wurde bei jedem Anschlag des Messerblocks um die eingestellte Mikrometerzahl angehoben. Somit wurde bei jeder Vorwärtsbewegung des Messerschlittens ein 7 µm dünner Schnitt geschnitten. Durch Überführung der Paraffinschnitte in ein 50°C warmes Wasserbad (Julabo U37A, A. Hartenstein GmbH) wurden sie geglättet, auf einen Objektträger gelegt und getrocknet. Über Nacht wurden

sie in einen bei 37°C temperierten Inkubator (CO₂ Incubator BBD 6220 Heraeus, Hanau, D) gestellt und anschließend bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

2.12 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

2.12.1 Grundlagen

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird als Übersichtsfärbung histologischer Schnitte verwendet. Die Zellkerne werden blau, das Zytoplasma rot angefärbt. Als Färbelösung wird der Farbstoff Hämatoxylin, ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, verwendet. Durch Zugabe von Oxidationsmittel wird dieser zu Hämatein aufbereitet. Durch Zugabe von Alaun entsteht aus Hämatein das Hämalaun (Carl Roth GmbH), welches seine färbende Wirkung entfaltet. Während der Färbung lagern sich die positiv geladenen Komplexverbindungen des Alauns an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleinsäuren in den Zellkernen. Die eigentliche tiefblaue Farbe der Kerne wird durch das Bläuen mit Leitungswasser erreicht. Eosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) ist ein synthetischer, saurer Farbstoff und färbt alle basischen Strukturen rot an, v. a. Zellplasmaproteine, Mitochondrien, Kollagen und endoplasmatisches Retikulum.

2.12.2 Vorbereitung der Paraffinschnitte für die Färbungen

Für histologische Färbungen muss das Einbettmittel aus den Schnitten wieder entfernt werden. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C oder 1 h bei 60°C im Inkubator aufbewahrt, um durch ein vorgeschaltetes Schmelzen die Entparaffinierung mit Xylol zu erleichtern. Zur Vorbereitung für die wässrigen Färbelösungen durchliefen sie eine absteigende Alkoholreihe (Tabelle 10). Da bei den Kryoschnitten kein Einbettmittel entfernt werden muss, war dieser Schritt zu ihrer Herstellung nicht notwendig.

Tabelle 10 Ablauf der Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

Lösung	Zeitablauf	Bemerkung
Xylol I Xylol II	10 min 10 min	Entparaffinierung
Ethanol 96% Ethanol 96% Ethanol 70% Ethanol 50%	jeweils 3 x für 1 sec in jede Lösung eintauchen	absteigende Reihe zur Rehydrierung
VE-Wasser	5 sec	schwenken

2.12.3 Färbung von Kryo- und Paraffinschnitten

In Tabelle 11 ist die Anleitung zur Färbung von Kryo- und Paraffinschnitten mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung dargestellt. Die Kryoschnitte wurden 1 min in Hämalaun gefärbt, die Paraffinschnitte bis zu 3 min.

Tabelle 11 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Schnitten

Lösung	Zeitablauf	Bemerkung
Hämalaun	1-3 min	Färbung der sauren Zellbestandteile
VE-Wasser	5 sec	Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs
HCl-Ethanol	2 x 1 sec	Differenzierung des Farbstoffs im sauren Milieu
VE-Wasser	1 sec	Spülen
Leitungswasser	5 min	Bläuen
Eosin	1 min	Färbung
VE-Wasser		Spülen
Ethanol 70%	2 x 1 sec	Aufsteigende Reihe zur Dehydrierung, in Ethanol 70% auch Differenzierung des Eosins
Ethanol 96%	2 min	
2-Propanol I	5 min	
2-Propanol II	5 min	
Xylol I	5 min	Entfernen des Ethanols
Xylol II	5 min	

2.13 Elektronenmikroskopie

2.13.1 Rasterelektronenmikroskopie

Um zu kontrollieren, ob sich humane Parotiszellen auf der Oberfläche der Konstrukte ansiedeln und wie sich die Vorbehandlungen der Matrices mit Laminin/Fibronectin, Fibrinkleber, Hydrogel und Fibroblasten auf die Besiedelungen auswirken, wurden Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen hergestellt. Durch diese spezielle Untersuchungsmethode ist es möglich, kleinste Strukturen auf der Oberfläche der Konstrukte zu erfassen, die in histologischen Schnitten nicht sichtbar werden. Die Konstrukte wurden nach einer Woche Besiedelung in PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden sie in 6,25%iges Glutaraldehyd (Merck KgaA) überführt und bei 4°C über Nacht stehen gelassen, um eine Stabilität der Proben zu gewährleisten. Nach ca. 12 h

wurden die Proben mit 100 Mm Sörensenpuffer (pH-Wert 7,4, AppliChem GmbH) gereinigt. Die 5-malige Waschung erfolgte in 5-minütigen Schritten. Durch eine aufsteigende Acetonreihe (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurden die Proben entwässert. Sie wurden 15 min in eine 30%ige Acetonlösung, 20 min in eine 50%ige Acetonlösung, 30 min in eine 75%ige Acetonlösung, 45 min in eine 90%ige Acetonlösung und anschließend 5 x 30 min in eine 100%ige Acetonlösung gegeben. Die Proben wurden in die nächste Lösung durch Abpipettieren der vorhergehenden Lösung überführt. Abhängig von der Größe wurden die Proben in ein grobmaschiges Drahtsieb (Specimen baskets, BAL-TEC AG, Balzers, LIE) überführt, in 100%igem Aceton gelagert und in die Probenkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (Critical Point Dryer, CPD 030, BAL-TEC AG) gelegt. Der CPD wurde zuvor auf 4°C heruntergekühlt. Unter einem Druck von 60 bar wurde ein 8-maliger Mediumwechsel in 5-minütigen Abständen mit 100%igem Aceton durchgeführt. Der Austausch erfolgte durch einströmendes, verflüssigtes CO₂. Am Ende des Mediumwechsels wurde die Kammer mit reinem CO₂ gefüllt. Die Kritisch-Punkt-Trocknung startete, indem die Temperatur auf 31°C und der Druck auf 74 bar erhöht wurde. Nach Erlangen des kritischen Punktes wurde die Heizung abgestellt und das CO₂ entwich langsam über einen Zeitraum von 2 h über ein Ablassventil. Die getrockneten Proben wurden auf kleine Raster-Tischchen (Plano GmbH, Wetzlar, D) mit doppelseitiger Klebefolie befestigt. Zusätzliche Knetmasse hielt die Proben in Position. Die Beschichtung der Oberfläche der Proben erfolgte in der Sputter-Beschichtungsvorrichtung (Sputter Coater SCD 005, BAL-TEC AG) mit einer Mischung aus Gold und Palladium (80/20). Die in die Kammer gefluteten, durch Argon-Gas erzeugten Ionen wurden im elektrischen Feld auf eine Scheibe aus Gold und Palladium beschleunigt und stießen aus dieser Atome heraus. Die Atome lagerten sich als dünne Gold- und Palladium-Schicht auf den Proben ab. Die fertigen Proben wurden in einem Exsikkator (Novus NS-Tubus, Duran Group GmbH Mainz, D) gelagert, in dem sie für mehrere Monate aufbewahrt werden konnten. Die Betrachtung und Fotodokumentation der Proben erfolgte in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg, in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Krohne an dem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop JSM 7500F (Jeol GmbH, Freising, D) bei 100- bis 1000facher Vergrößerung.

2.13.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Charakterisierung von einzelnen, humanen Parotiszellen wurden Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen angefertigt. Die Konstrukte oder

Zellen aus der *in vitro* Kultur wurden in PBS gewaschen und in 2,5%ig gepufferten Glutaraldehyd (Merck KgaA) über 1 h fixiert. Die weiteren Behandlungsschritte der Proben sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12 Weitere Behandlungsschritte des TEM-Protokolls

Lösung	Zeitablauf	Bemerkung
Glutaraldehyd (2,5%)	45 min	Fixierung
Cacodylatpuffer pH 7,2 (50mM, Carl Roth GmbH)	5 x 3 min	Waschung
Osmiumtetroxid (OsO ₄ , 2%, Science Serices, München, D)	90-120 min	Kontrastierung: Proben färben sich schwarz
H ₂ O	5 x 3 min	Waschung
Uranylacetat (0,5%, Merck KgaA)	über Nacht	Kontrastierung
H ₂ O	5 x 3 min	Waschung
0% Ethanol 4°C 50% Ethanol 4°C 70% Ethanol 4°C 90% Ethanol 4°C 96% Ethanol 4°C 100% Ethanol 4°C Propylenoxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	30 min 30 min 30 min 30 min 30 min 3 x 30 min 3 x 30 min	Entwässerungsreihe: Beim Abpipettieren der Entwässerungslösungen muss ein Flüssigkeitsrest im Gefäß zur Verhinderung einer Austrocknung bleiben. Raumtemperatur
Propylenoxid : Epon 812 (1:1) Epon 812 (Serva, Eppelheim, D)	über Nacht 2 x 2h	Einbettung
	48 h	Polymerisation bei 60°

Die eingebetteten, ausgehärteten Kristalle wurden im Ultramikrotom EM UC7 (Leica Microsystems GmbH) eingespannt und in 60-70 nm dünne Schnitte geschnitten.

Die Betrachtung und Fotodokumentation der Proben erfolgte an dem Transmissionselektronenmikroskop JEM 2100 (Jeol GmbH, Freising, D) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Würzburg.

2.14 Statistische Verfahren

Die Besiedelungsversuche dienten in erster Linie dazu, eine Methode zu entwickeln, Matrices aus dezellularisierter, porciner Speicheldrüse mit humanen Parotiszellen erfolgreich zu besiedeln und somit die Biokompatibilität der Matrix gegenüber den Zellen zu beweisen. Daher können diese Vorversuche nicht für statistische Zwecke genutzt werden. Man könnte in weiteren Versuchen die Ergebnisse des letzten erfolgreichen Besiedelungsversuch verwenden, diesen in höherer Anzahl reproduzieren und statistisch die α -Amylaseproduktion der humanen Parotiszellen auf den besiedelten Matrices mit entsprechenden PCR-Ergebnissen auswerten.

2.15 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Zur graphischen Darstellung der Genexpression von α -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 18 wurden Balkendiagramme mit dem Microsoft Excel-Programm 2010 hergestellt. Die y-Achse zeigte dabei die Genexpression relativ zu Patient 1, die x-Achse die Passagen 1-3 der Patienten 1-3 (Kapitel 3.2.3) an. Auch bei der Darstellung der durchschnittlichen Produktionswerte in der Immunfluoreszenz von α -Amylase und Pan-Cytokeratin wurden Balkendiagramme des Microsoft Excel-Programms 2010 verwendet. Die y-Achse zeigte die α -Amylase- und Pan-Cytokeratin-Produktion in %, die x-Achse die Patienten 1-10 an (Kapitel 3.2.4).

Für die Standardkurve des DNA-Assays (Kapitel 2.2.2), dem FastinTM Elastin Assays (Kapitel 2.2.3) und dem SircolTM Soluble Collagen Assays (Kapitel 2.2.4) wurde mit Hilfe des Microsoft Excel-Programms 2010 ein Punktdiagramm mit errechneter Geradengleichung erstellt.

3 Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der molekularbiologischen, histologischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Analyse der *in vitro* gezüchteten, humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen und ihre Besiedelung auf einer Matrix aus dezellularisierter, porciner Speicheldrüse betrachtet.

3.1 Charakterisierung der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüse

3.1.1 Makroskopische Betrachtung von nativem und dezellularem Speicheldrüsengewebe

Makroskopisch zeigten die nativen, porcinen Speicheldrüsenstücke eine rot-bräunliche Farbe auf (Abbildung 1, Kapitel 2.1.1). Nach dem Dezellularisierungsprozess erschienen die porcinen Speicheldrüsenstücke durch das Herauslösen von zellulären Bestandteilen weißlich (Abbildung 2, Kapitel 2.1.2).

3.1.2 Auswertung histologischer Schnitte von dezellularem und nativem Speicheldrüsengewebe

In den HE-gefärbten Paraffinschnitten von nativem, humanem (Abbildung 11 A-B) und porcinem Speicheldrüsengewebe (Abbildung 11 C-D) konnte man Azinuszellen mit rundem, violetter Zellkern erkennen, die beerenartig angeordnet waren und ein enges Lumen aufwiesen. Das porcine Speicheldrüsengewebe erschien dichter mit mehr Azinuszellen und weniger Bindegewebe. Vor allem im humanen Parotisgewebe waren polyedrische Fettgewebszellen mit abgeflachten Zellkernen eingelagert. Auch kubisch-hochprismatische Streifenstücke mit basaler Streifung und großem Lumen waren erkennbar.

Bei den mit HE-gefärbten Schnitten von dezellulierten, porcinen Speicheldrüsenstücken (Abbildung 11 E-F) konnte man ein durch die Eosinfärbung rötlich erscheinendes Bindegewebsgerüst mit wabenartiger Struktur erkennen. Die Struktur der Blutgefäße, Azini und Speicheldrüsengänge blieb gut erhalten. Es konnten keine vitalen Zellkerne durch eine Blaufärbung nachgewiesen werden.

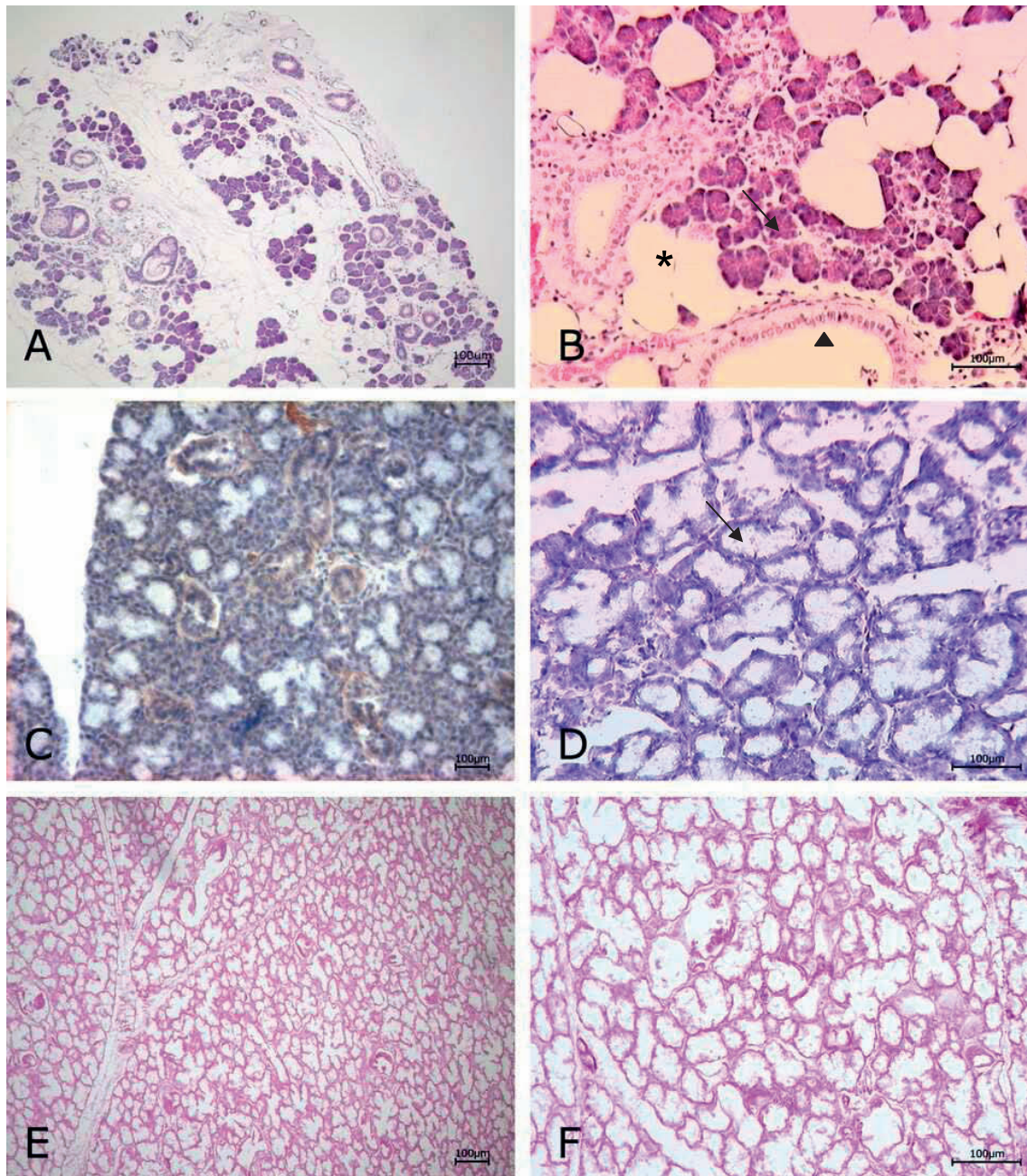


Abbildung 11 HE-Färbung, jeweils von zwei unterschiedlichen Vergrößerungen und Stellen. A-B: Native, humane Glandula parotidea. C-D: Native, porcine Glandula mandibularis. E-F: Dezellularisierte, porcine Glandula mandibularis. Dargestellt sind Drüsenazini (Pfeil), Ausführungsgänge (Dreieck) und dazwischengelagerte Adipozyten (Stern).

Auf den Paraffinschnitten der nativen, porcinen Speicheldrüsenstücke der Glandula mandibularis, die mit der Feulgenfärbung behandelt wurden, färbten sich deren Zellkerne violett-schwarz an (Abbildung 12 A). Im Gegensatz dazu erfolgte keine violette Anfärbung von Zellkernen auf den Paraffinschnitten der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke (Abbildung 12 B).

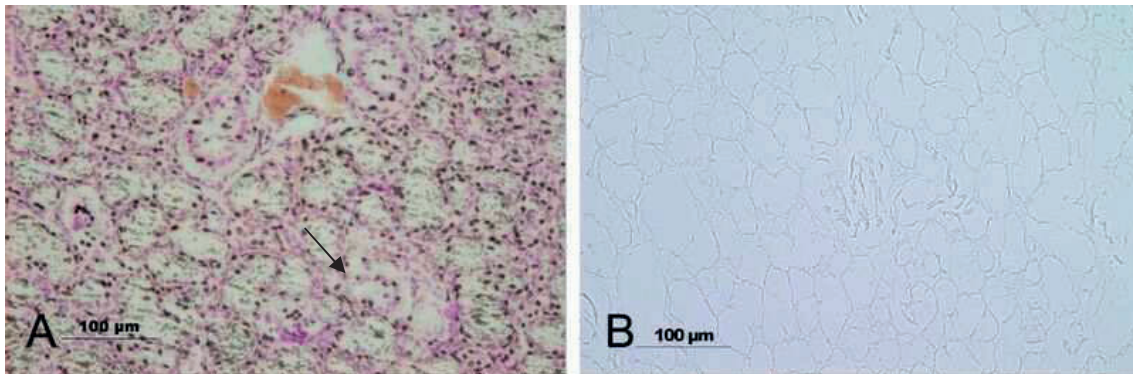


Abbildung 12 Feulgenfärbung. A: Native, porcine Speicheldrüse. B: Dezellularisierte, porcine Speicheldrüse. Dargestellt sind Zellkerne, die sich violett-schwarz anfärben (Pfeil).

3.1.3 DNA-Gehalt-Messung von dezellularisiertem und nativem, porcinen Speicheldrüsengewebe

Der DNA-Gehalt der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke SD 1, 2 und 3 lag bei 0-0,52 ng in 1 mg Speicheldrüsengewebe. Im Gegensatz dazu wurde bei den nativen, porcinen Speicheldrüsenstücken SD 4, 5 und 6 höhere DNA-Werte von 61,77-69,74 ng in 1 mg Speicheldrüsengewebe gemessen. Der DNA-Gehalt der porcinen Speicheldrüsenstücke wurde in Abbildung 13 graphisch dargestellt. In Tabelle 13 sind die DNA-Werte von SD 1-6 aufgeführt.

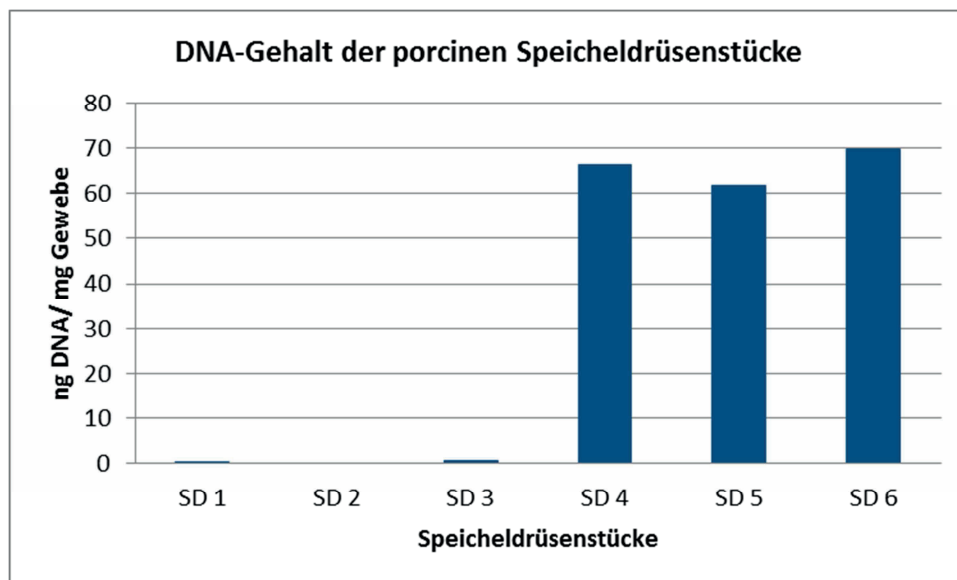


Abbildung 13 Graphische Darstellung des DNA-Gehaltes von SD 1-6 in ng/ mg Gewebe.

Tabelle 13 DNA-Gehalt der dezellularisierten und nativen, porcinen Speicheldrüsenstücke

Speicheldrüse	nm (Mittelwert)	ng/ml DNA	mg Gewebe	ng DNA/ mg Gewebe
SD 1	2535	5,27	14	0,19
SD 2	2255	0	13,9	0
SD 3	2582	6,29	12	0,52
SD 4	43526	893,85	13,5	66,21
SD 5	38767	790,69	12,8	61,77
SD 6	39806	813,21	11,66	69,74

3.1.4 Elastingehalt-Messung von dezellularisiertem und nativem, porcinen Speicheldrüsenngewebe

Der Elastingehalt der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke SD 1, 2 und 3 lag bei 1,39-1,59 μg Elastin in 1 mg Speicheldrüsenngewebe. Im Gegensatz dazu wurde bei den nativen, porcinen Speicheldrüsenstücken SD 4, 5 und 6 höhere Elastinwerte von 3,43-7,7 μg Elastin in 1 mg Speicheldrüsenngewebe gemessen. Der Elastingehalt der porcinen Speicheldrüsenstücke wurde in Abbildung 14 graphisch dargestellt. In Tabelle 14 sind die Elastinwerte von SD 1-6 aufgeführt.

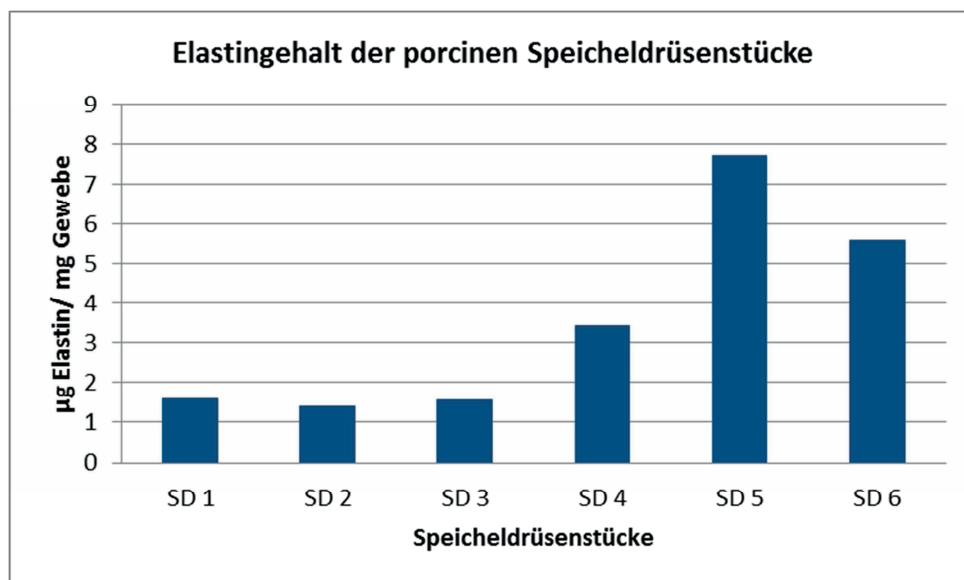


Abbildung 14 Graphische Darstellung des Elastingehaltes von SD 1-6 in μg / mg Gewebe.

Tabelle 14 Elastingehalt der dezellularisierten und nativen, porcinen Speicheldrüsenstücke

Speicheldrüse	nm (Mittelwert)	µg Elastin	mg Gewebe	µg Elastin/ mg Gewebe
SD 1	0,8484	19,59	12,3	1,59
SD 2	0,7954	18,05	13	1,39
SD 3	0,8668	20,13	13,2	1,56
SD 4	0,784	40,51	11,8	3,43
SD 5	1,527	39,27	10,2	7,7
SD 6	1,0943	58,55	10,5	5,58

3.1.5 Kollagengehalt-Messung von dezellularisiertem und nativem, porcinen Speicheldrüsengewebe

Der Kollagengehalt der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke SD 1, 2, 3 lag bei 2,21-2,96 µg Kollagen in 1 mg Speicheldrüsengewebe. Im Gegensatz dazu wurde bei den nativen, porcinen Speicheldrüsenstücken SD 4, 5, 6 höhere Kollagenwerte von 11,09-14,82 µg Kollagen in 1 mg Speicheldrüsengewebe gemessen. Der Kollagengehalt der porcinen Speicheldrüsenstücke wurde in Abbildung 15 graphisch dargestellt. In Tabelle 15 sind die Kollagenwerte von SD 1-6 aufgeführt.

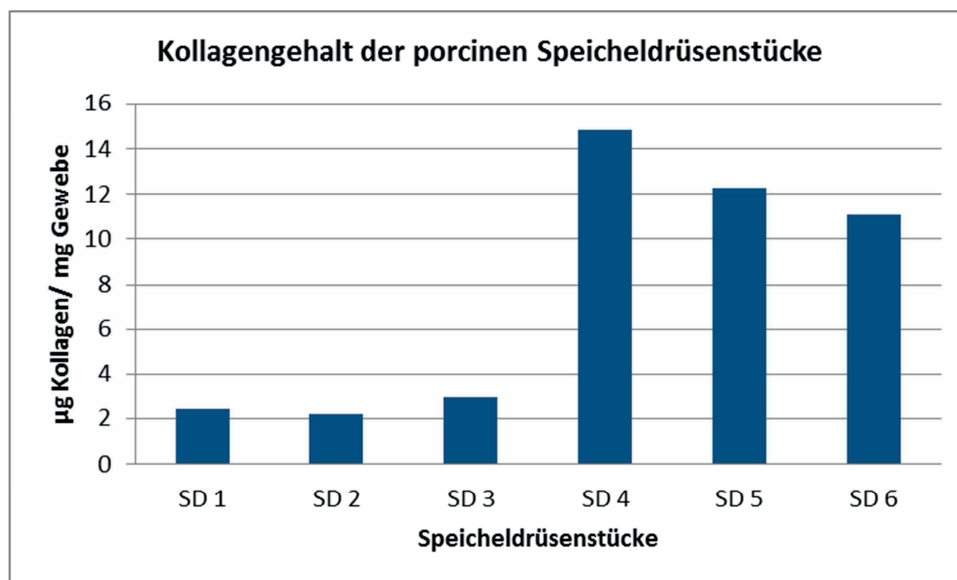


Abbildung 15 Graphische Darstellung des Kollagengehaltes von SD 1-6 in µg/ mg Gewebe.

Tabelle 15 Kollagengehalt der dezellularisierten und nativen, porcinen Speicheldrüsenstücke

Speicheldrüse	nm (Mittelwert)	µg Kollagen	mg Gewebe	µg Kollagen/ mg Gewebe
SD 1	1,93	49,12	20	2,45
SD 2	1,83	46,41	21	2,21
SD 3	2,31	59,13	20	2,96
SD 4	1,76	44,45	3	14,82
SD 5	1,47	36,92	3	12,26
SD 6	1,33	33,1	3	11,09

3.1.6 Gallensäuretest zur Bewertung des Desoxycholsäuregehalts im Überstand der dezellularisierten Speicheldrüsenstücke

Reste von Desoxycholsäure wurde in den PBS-Überständen ÜS 1 und ÜS 2 nachgewiesen, in der die dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke nach der Dezellularisierung aufbewahrt wurden (Abbildung 16, Tabelle 16). Die gemessenen Werte der 1:50 verdünnten ND und der reinen PBS-Lösung dienten als Vergleich.

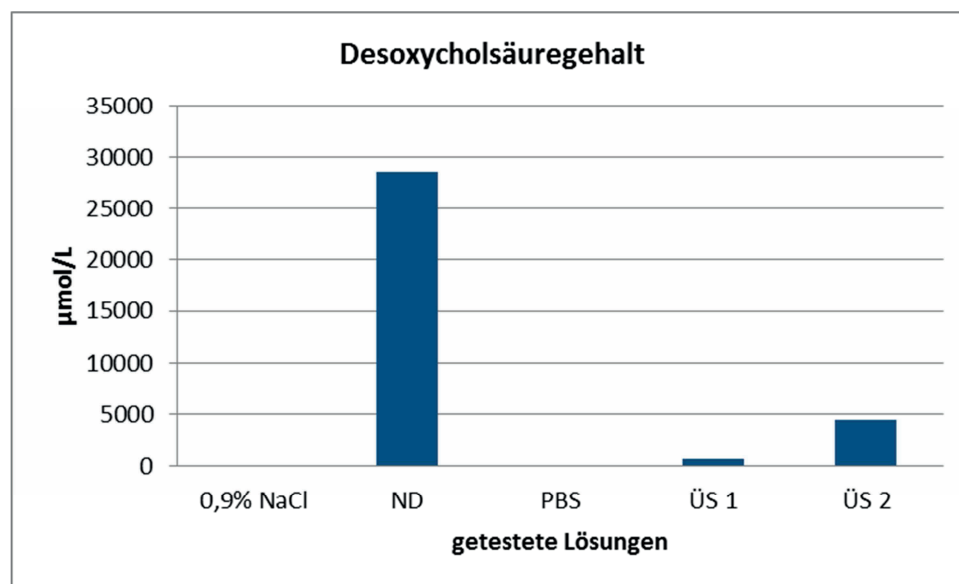


Abbildung 16 Graphische Darstellung des Desoxycholsäuregehaltes der getesteten Lösungen in µmol/L.

Tabelle 16 Desoxycholsäuregehalt der getesteten Lösungen

Getestete Lösungen	Desoxycholsäuregehalt in $\mu\text{mol/L}$
0,9% NaCl	0,00
ND	28595,1
PBS	0,87
ÜS 1	711,17
ÜS 2	4415,36

3.2 Charakterisierung der humanen Parotiszellen

3.2.1 Kultivierungserfolg der humanen Parotiszellen in 2-dimensionaler Monokultur

Nach einer Dauer von 7-14 Tagen der Kultivierung von 1 cm³ großen, humanen Parotisstücken konnte man einzelne, am Boden der Kulturplatten anheftende Zellen unter dem Lichtmikroskop erkennen (Abbildung 17 A). Nach ca. 2-3 Wochen bildeten die Zellen einen konfluierenden Zellrasen (Abbildung 17 B). Ab einer Konfluenz von ca. 80% (Abbildung 17 C) wurden die Zellen passagiert und auf 2-3 Zellkulturflaschen (25 mm²) mit 5 ml BEGM aufgeteilt. Die Vitalität der Zellen wurde mit der Trypanblau-Methode überprüft. Diese lag bei über 85%. Bei Vorliegen von einem Fibroblastenanteil von ca. 30% wurden die Wells verworfen (Abbildung 17 D).

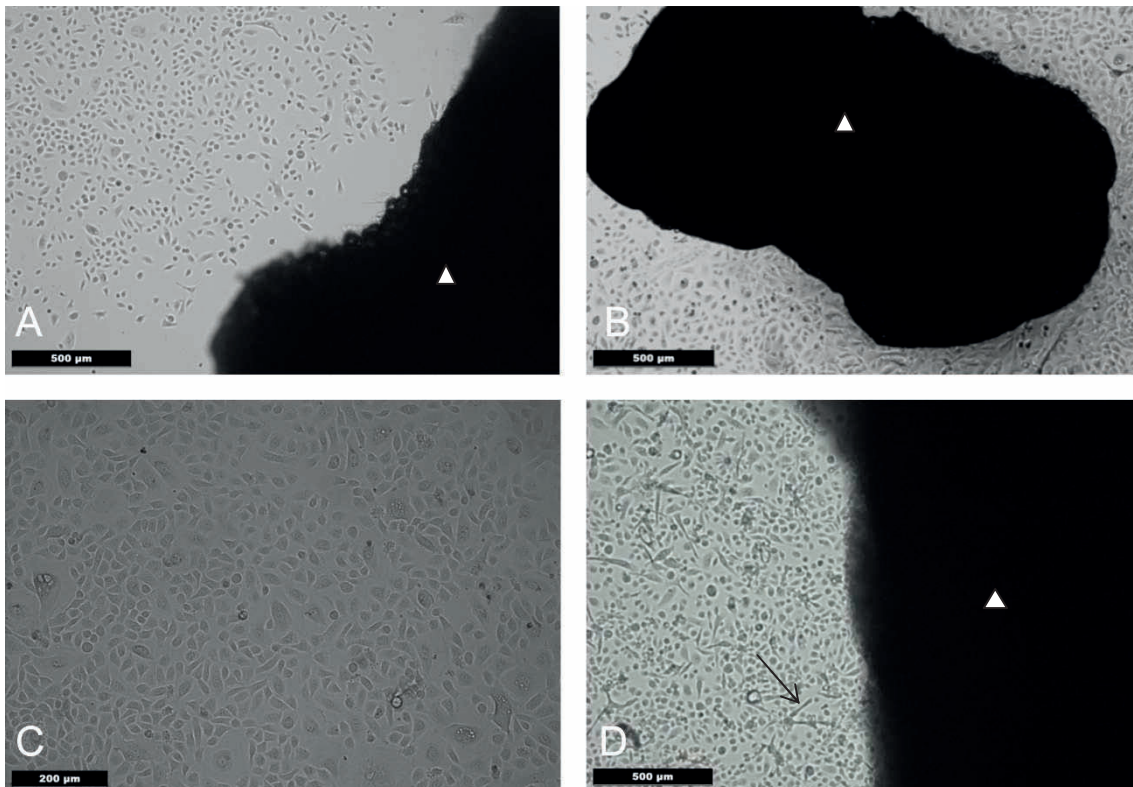


Abbildung 17 Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen Parotiszellen am Boden der Kulturplatte. A: Zellkultur nach 7 Tagen. B: Zellkultur nach 12 Tagen mit guter Konfluenz der Zellen. C: Zellkultur nach 14 Tagen mit geringer Anzahl an Fibroblasten. D: Zellkultur nach 12 Tagen mit ca. 30% Fibroblastenanteil. Dargestellt sind ein Fibroblast mit länglicher Form (Pfeil) und das Parotisstück (Dreieck).

3.2.2 Auswertung der Gradienten-Polymerase-Kettenreaktion für die Primer α -Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5

Nach Ablauf der Gelelektrophorese kam es bei jeder Probe zur Bandenbildung, außer bei der Negativkontrolle (NK). Die Banden waren bei den Annealing-Temperaturen zwischen 51-61°C gleich stark ausgeprägt. Die Bande für EF1 α erschien als Positivkontrolle (PK). Es folgten die Banden für α -Amylase bei Temperaturen von 51°C, 52,8°C, 57,5°C, 59,2°C und 61°C. Die Banden von Cytokeratin 18 erschienen bei den Temperaturen 53,7°C, 57,4°C, 59,2°C und 61°C, die Banden von Aquaporin 5 bei 52,8°C, 53,7°C, 59,2°C und 61°C. Das Erscheinen der Banden bewies die Wirksamkeit der Primer. Die quantitative PCR der zu untersuchenden Proben konnte nun für jeden Primer mit einer Annealing-Temperatur von 61°C durchgeführt werden. Die Produktlänge befand sich im Bereich von 150–300 Basenpaaren (bp). Von α -Amylase lag sie bei 221 bp, von Cytokeratin 18 bei 278 bp und von Aquaporin 5 bei 169 bp. Sie wurde anhand der DNA-Leiter abgelesen, die aus 14 chromatographisch

aufgereinigten, einzelnen DNA-Fragmenten zwischen 100-3000 bp bestand. Die Gelelektrophorese ist in Abbildung 18 dargestellt.

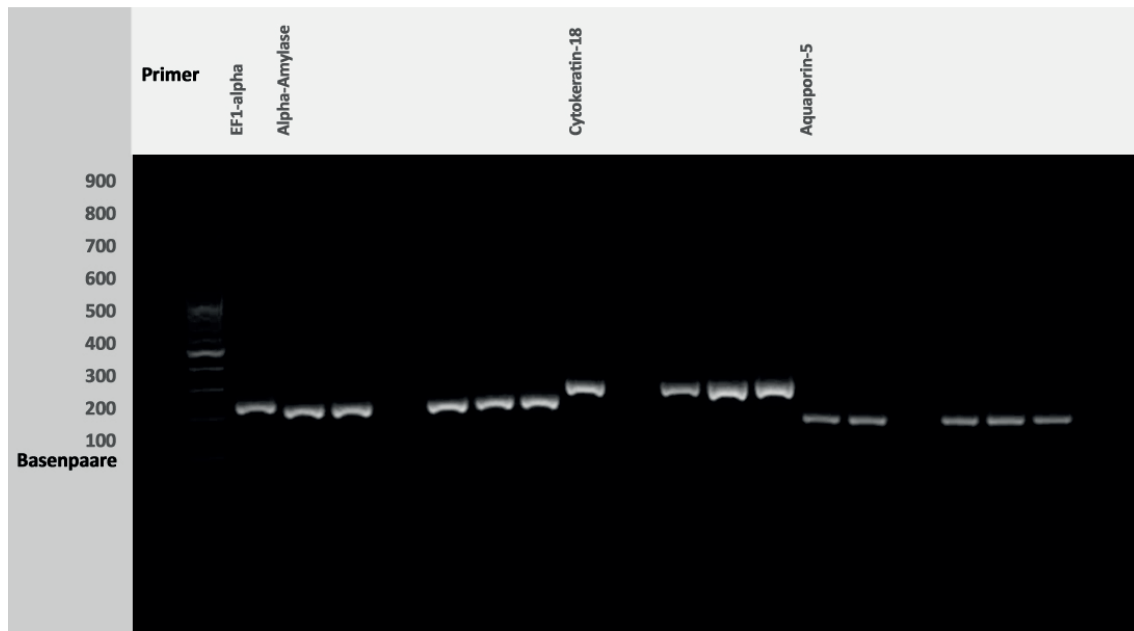


Abbildung 18 Gelelektrophorese der Primer: EF1 α (PK). α -Amylase (bp 221): 51°C, 52,8°C, NK, 57,4°C, 59,2°C, 61°C. Cytokeratin 18 (bp 278): 53,7°C, NK, 57,4°C, 59,2°C, 61°C. Aquaporin 5 (bp 169): 52,8°C, 53,7°C, NK, 59,2°C, 61°C.

3.2.3 Nachweis von α -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin 18 in humanen Parotiszellen und humanem Parotisgewebe mittels quantitativer Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

In der Tabelle 17 wurden die durchschnittlichen CT-Werte von α -Amylase, Cytokeratin 18, Aquaporin 5, GAPDH und EF1 α dargestellt, die in *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen von Passage 1-3 der 3 Patienten exprimiert und mittels der Real-Time-PCR ermittelt wurden. Im Vergleich sind die durchschnittlichen CT-Werte von α -Amylase, Cytokeratin 18, Aquaporin 5 und GAPDH aufgeführt, die in humanem Parotisgewebe zweier Patienten A+B exprimiert wurden. Je höher der CT-Wert ausfiel, desto weniger stark wurde das Zielgen in den Zellen exprimiert. Cytokeratin 18, EF1 α und GAPDH wurden am stärksten exprimiert, gefolgt von α -Amylase. Die CT-Werte von Aquaporin 5 lagen bei humanem Parotisgewebe bei 34, bei humanen Parotiszellen bei 37,42, was auf eine sehr schwache Genexpression schließen ließ.

Tabelle 17 Durchschnittliche CT-Werte aller Passagen der Patienten 1-3

Primer	CT-Werte HPZ*	CT-Werte HPG**
α -Amylase	30,38	23,7
Cytokeratin 18	23,84	24,5
Aquaporin 5	37,42	34
GAPDH	22,13	23,2
EF1 α	18,38	

Humane Parotiszellen*, Humanes Parotisgewebe**

Für den Vergleich der Genexpression über die 3 Passagen der kultivierten Parotiszellen der Patienten 1-3 wurden die Formeln von Kapitel 2.7.3 verwendet. Die graphische Darstellung der errechneten Werte ist in Abbildung 19-21 zu sehen, wobei der CT-Wert der ersten Passage =1 gesetzt wurde.

Die Relativen Genexpressionswerte wichen bis auf einen Wert von Cytokeratin 18 in P3 von Pat.1 nicht mehr als 1,6 Punkte voneinander ab. So kann von einer unveränderten Genexpression der Gene α -Amylase, Cytokeratin 18 und Aquaporin 5 über die 3 Passagen der 3 Patienten ausgegangen werden.

Die PCR-Ergebnisse sind den Tabellen 27-30 im Kapitel 6.2.1 zu entnehmen.

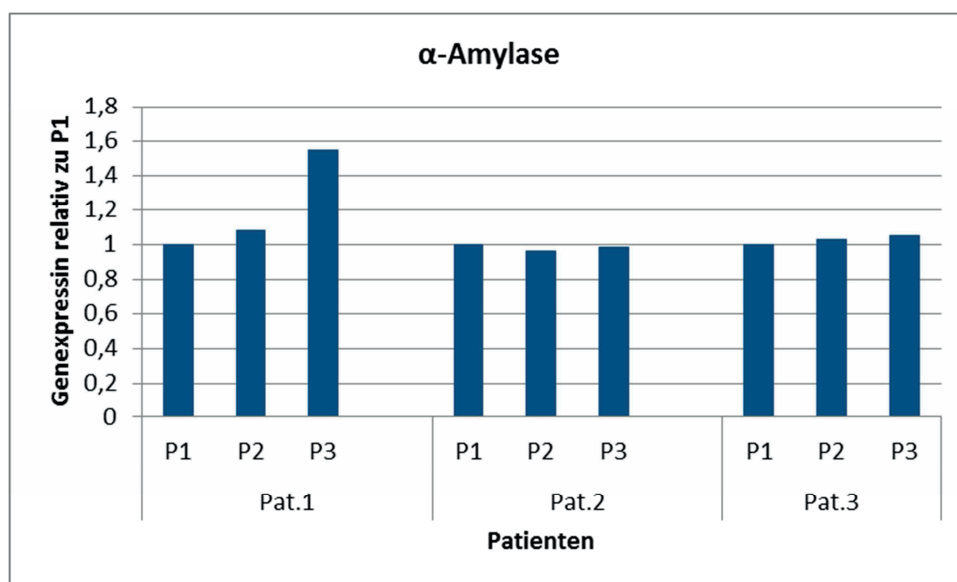


Abbildung 19 Graphische Darstellung der relativen Genexpression von α -Amylase der Patienten 1-3 über die Passagen 1-3. P1=1.

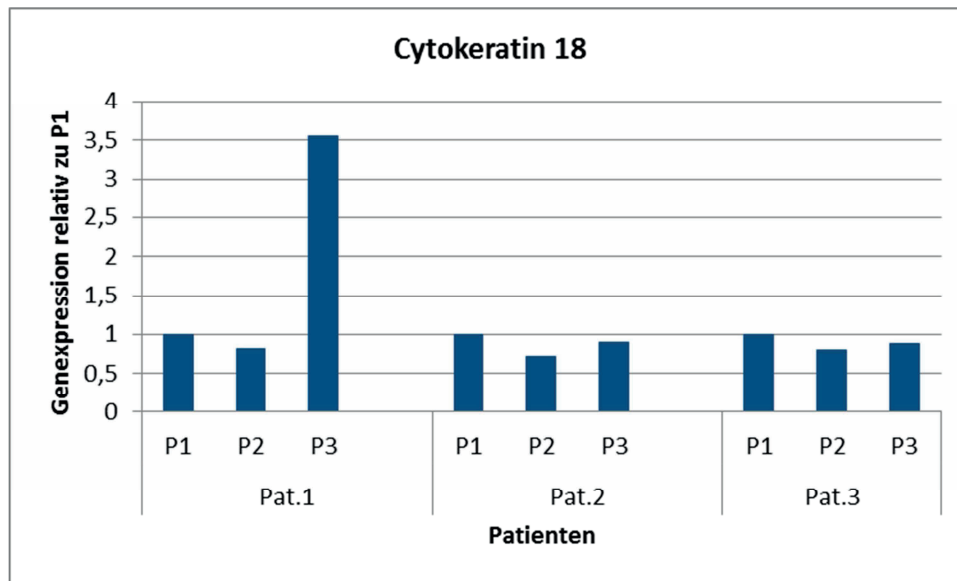


Abbildung 20 Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Cytokeratin 18 der Patienten 1-3 über die Passagen 1-3. P1=1.

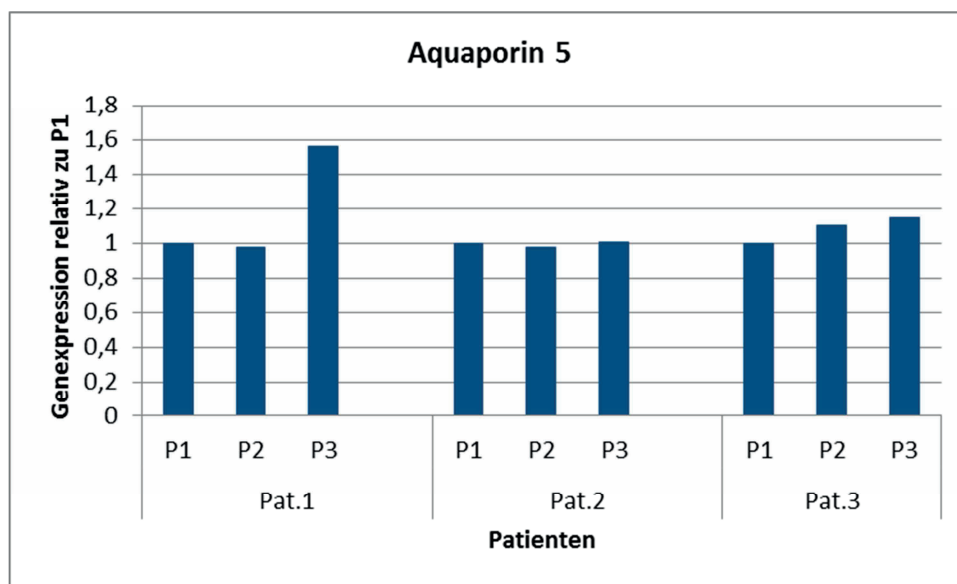


Abbildung 21 Graphische Darstellung der relativen Genexpression von Aquaporin 5 der Patienten 1-3 über die Passagen 1-3. P1=1.

3.2.4 Nachweis von α -Amylase, Aquaporin 5 und Pan-Cytokeratin in humanen Parotiszellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen

Um das Vorhandensein von α -Amylase im Zytoplasma sowie den Aquaporin-Wasserkanal 5 in der Zellwand und Pan-Cytokeratin als Teil des Zytoskeletts in humanen Parotiszellen zu überprüfen, wurden humane Parotiszellen in 2-dimensionaler Monokultur von 10 Patienten über 3 Passagen kultiviert und mit dem Immunfluoreszenzprotokoll von Kapitel 2.8.2 angefärbt. Der Prozentanteil der α -

Amylase-, Pan-Cytokeratin- und Aquaporin 5-enhaltenden Zellen zu allen DAPI-gefärbten Zellkernen wurde errechnet und in Tabelle 31, Kapitel 6.2.2 dargestellt.

Bei der Anfärbung der Fibroblasten als Negativkontrolle erhielt man durch den DAPI-Farbstoff eine blaue Fluoreszenz der Zellkerne (Abbildung 22 E). Eine grüne oder rote Fluoreszenz durch die Sekundärantikörper war nicht erkennbar (Abbildung 22 F).

Die Kryoschnitte des humanen Parotisgewebes als Positivkontrolle zeigten eine grüne, blaue und rote Fluoreszenz, dargestellt in Abbildung 22 A-D. Abbildung 23 A-C und Abbildung 24 A-D. So konnte nachgewiesen werden, dass das humane Parotisgewebe Pan-Cytokeratin, α -Amylase und Aquaporin 5 enthält.

Die im Zytoplasma der Zellen enthaltene α -Amylase zeigte eine rote Fluoreszenz durch den verwendeten Sekundärantikörper Alexa Fluor 555. In Abbildung 22 wurden die Zellen sowohl mit α -Amylase- als auch mit Pan-Cytokeratin-Antikörper inkubiert und die Bilder übereinander projiziert (Abbildung 22 D, J). Innerhalb der Passagen von 1-3 eines Patienten blieb der errechnete Prozentsatz der α -Amylase-produzierenden Zellen weitestgehend konstant. Doch je nach Parotismaterial der 10 Patienten traten sehr große Schwankungen der Anfärbung zwischen 6,2-100% auf. In Abbildung 22 G-J wurde zur Verdeutlichung Zellen eines Patienten ausgewählt, die eine 100%ige Anfärbung mit α -Amylase (Abbildung 22 I) und Pan-Cytokeratin (Abbildung 22 H) aufwiesen.

Die grüne Fluoreszenz (Sekundärantikörper Alexa Fluor 488, Abbildung 23) der Pan-Cytokeratinfärbung war meist sehr gut in den humanen Parotiszellen über alle 3 Passagen der 10 Patienten ausgeprägt. Es traten selten Schwankungen auf. Abbildung 23 G zeigt humane Parotiszellen eines Patienten, die eine 100%ige Färbung mit Pan-Cytokeratin aufwiesen.

Aquaporin 5 (Sekundärantikörper Alexa Fluor 647, Abbildung 24) wurde in den humanen Parotiszellen *in vitro* nicht nachgewiesen. Als Beispiel dient die Abbildung 24 G. Die humanen Parotiszellen eines Patienten zeigten keine rote Fluoreszenz. Kryoschnitte von humanem Parotisgewebe fluoreszierten jedoch rot (Abbildung 24 C, D) und bewiesen dadurch die Anwesenheit von Aquaporin 5.

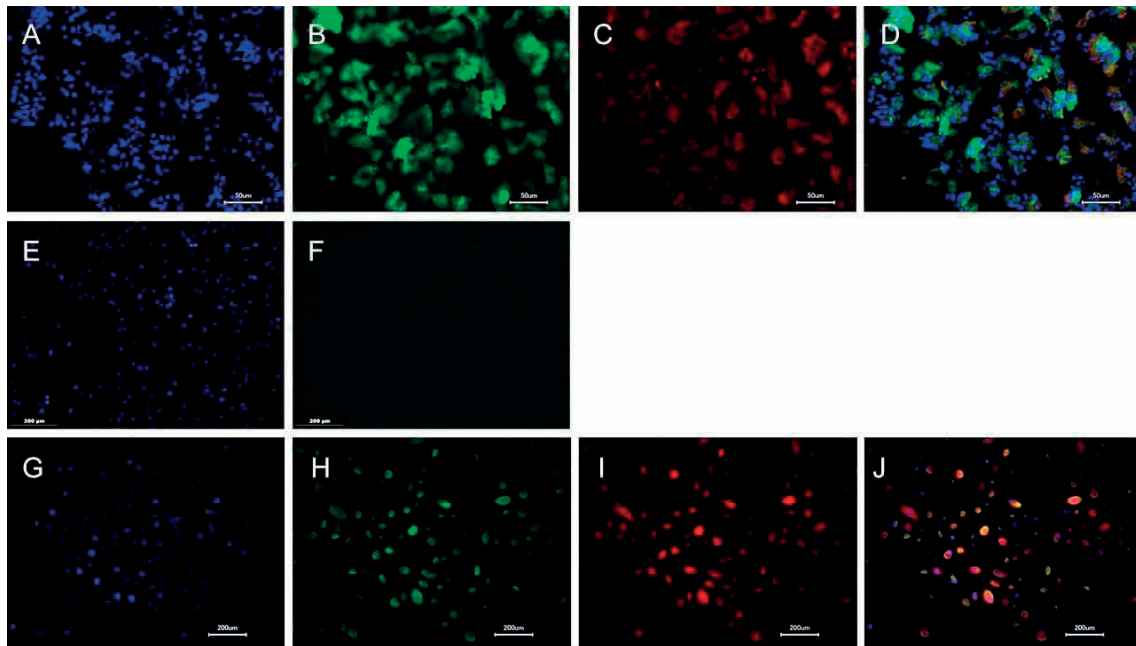


Abbildung 22 Immunhistochemische Färbung gegen α -Amylase (Alexa Fluor 555) und Pan-Cytokeratin (Alexa Fluor 488). A-D: Positivkontrolle: humanes Parotisgewebe im Kryoschnitt. E-F: Negativkontrolle: Fibroblasten *in vitro*. G-J: Primäre adhärenente Zellen der Glandula parotidea. A,E,G: DAPI-Anfärbung der Zellkerne. B,F,H: Pan-Cytokeratin-Färbung. C,I: α -Amylase-Färbung. D,J: Überlagerung der vorherigen Bilder.

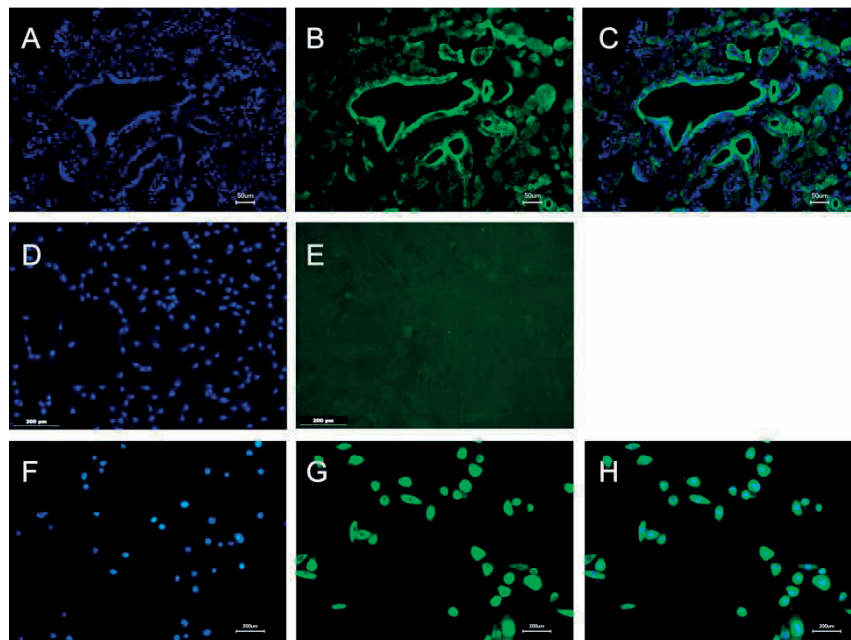


Abbildung 23 Immunhistochemische Färbung gegen Pan-Cytokeratin (Alexa Fluor 488). A-C: Positivkontrolle: Humanes Parotisgewebe im Kryoschnitt. D-E: Negativkontrolle: Fibroblasten *in vitro*. F-H: primäre adhärenente Zellen der Glandula parotidea eines Patienten. A,D,F: DAPI-Anfärbung. B,E,G: Pan-Cytokeratin-Färbung. C,H: Überlagerung der vorherigen Bilder.

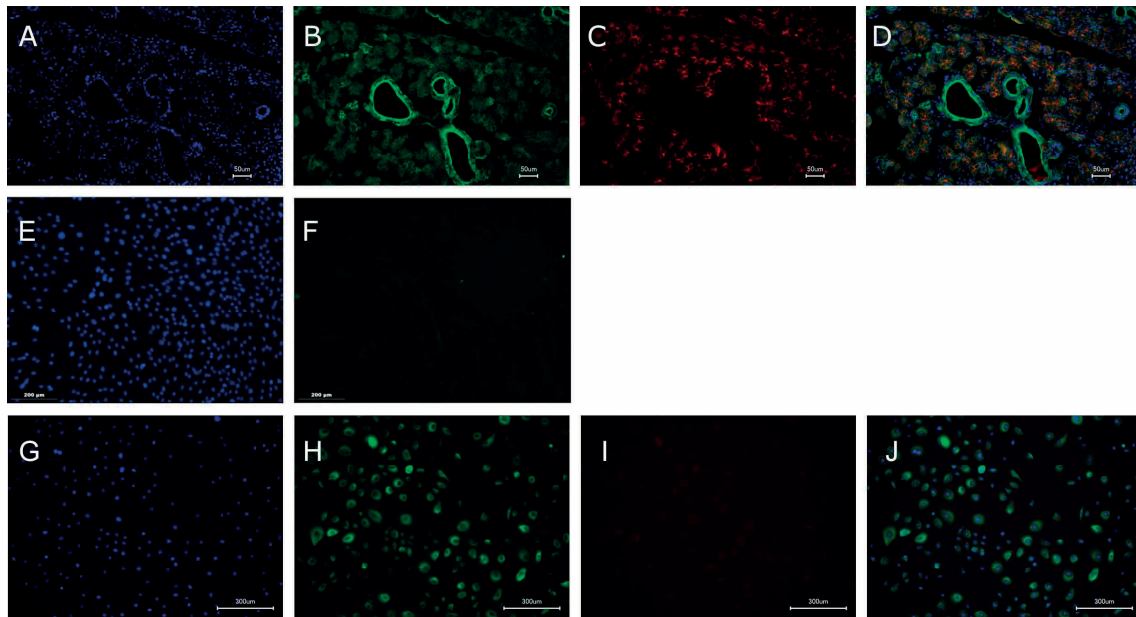


Abbildung 24 Immunhistochemische Färbung gegen Aquaporin 5 (Alexa Fluor 647).
A-D: Positivkontrolle: Humanes Parotisgewebe im Kryoschnitt.
E-F: Negativkontrolle: Fibroblasten *in vitro*. G-J: Primäre adhärenzte Zellen der Glandula parotidea. A,E,G: DAPI-Anfärbung. B,F,H: Pan-Cytokeratin-Färbung. C,I: Aquaporin 5-Färbung. D,J: Überlagerung der vorherigen Bilder.

In Abbildung 25-26 wurde der durchschnittliche Wert der α -Amylase- und Pan-Cytokeratin-produzierenden Zellen in % der Passagen 1-3 der Patienten 1-10 errechnet und graphisch dargestellt.

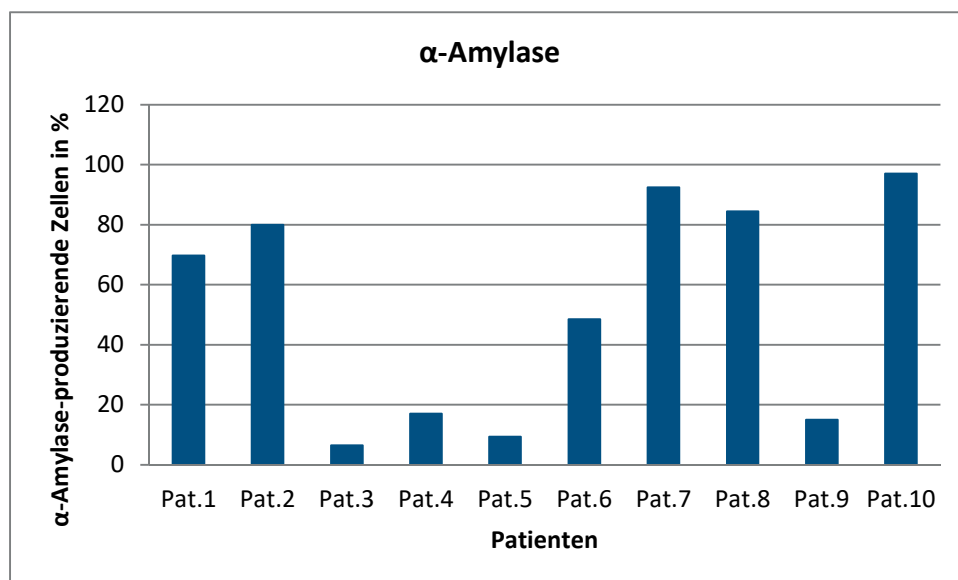


Abbildung 25 Graphische Darstellung der durchschnittlichen α -Amylase-produzierenden Zellen in % der Passagen 1-3 der Patienten 1-10.

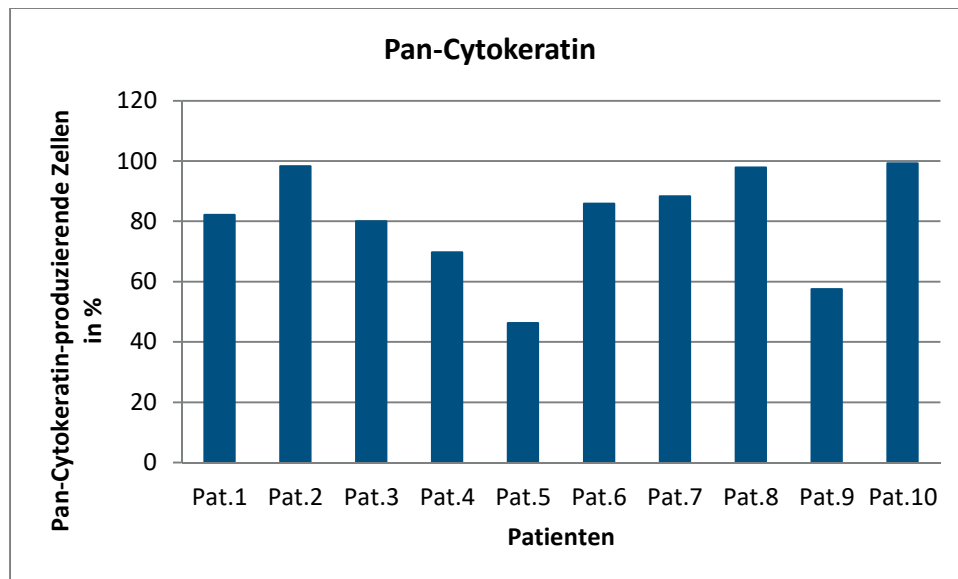


Abbildung 26 Graphische Darstellung der durchschnittlichen Pan-Cytokeratin-produzierenden Zellen in % der Passagen 1-3 der Patienten 1-10.

3.2.5 Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen von humanen Parotiszellen in 2-dimensionaler Monokultur

Zur Charakterisierung von *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie Bilder von einzelnen Zellen hergestellt. Diese wurden aus Zellkulturflaschen der Passage 2 eines Patienten gewonnen. Man erkennt in Abbildung 27 A-B Zellen mit einem runden Zellkern, um den im Zytoplasma viele, kleine Vesikel angeordnet waren. An der Oberfläche der umgebenden Plasmamembran bildeten die Zellen Zellfortsätze aus.

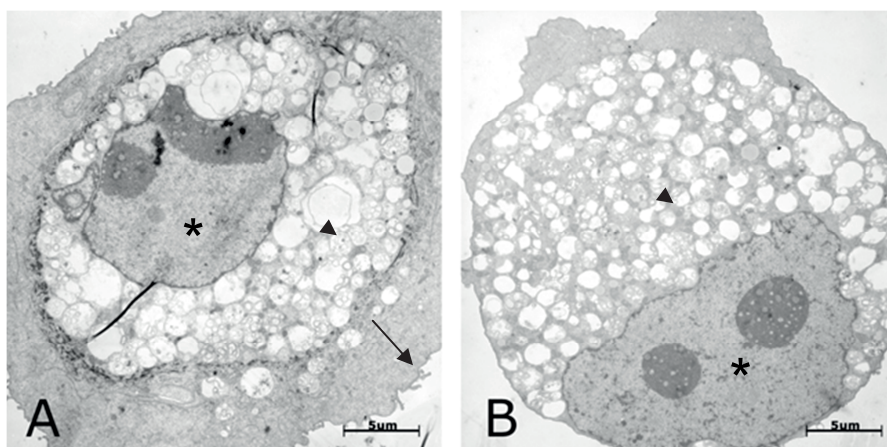


Abbildung 27 Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen von *in vitro* kultivierten, humanen Parotiszellen der Passage 2. Dargestellt sind Zellfortsätze auf der Plasmamembran (Pfeil), Zellkern (Stern) und Vesikel im Zytoplasma (Dreieck).

3.3 Auswertung der Besiedelungsversuche von dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücken als Matrix

Die Beurteilung der Besiedelungsversuche erfolgte histologisch, immunhistochemisch und durch Rasterelektronenmikroskopie.

3.3.1 Pilotstudie: Auswertung der ersten Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Fibrinkleber

Die in Kapitel 2.9.3 beschriebenen Besiedelungsversuche Nr. 1-5 wurden ausgewertet.

In den zwei Tagen nach der Besiedelung setzten sich die meisten Zellen, die zur Besiedelung auf die Matrix aufgebracht wurden, auf dem Boden der Wellplatte ab. Die FDA/EB-Vitalfärbung (Kapitel 2.10.1) dieser Zellen im Versuch Nr. 5 (Kapitel 2.9.3) ergab hauptsächlich avitale Zellen. Als Beispiel dient die Abbildung 28.

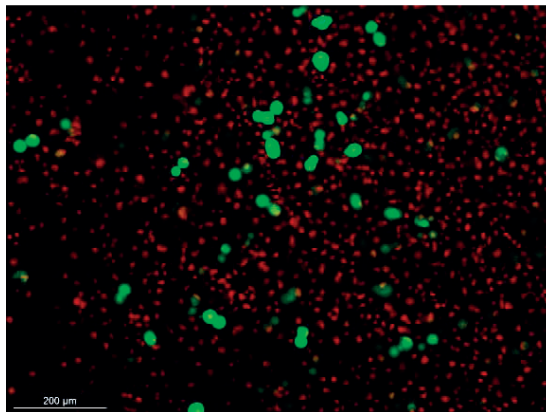


Abbildung 28 FDA/EB-Vitalfärbung der nicht anhaftenden, humanen Parotiszellen des Besiedelungsversuches Nr. 5 (Kapitel 2.9.3), die sich auf dem Wellboden sammelten. Vitale Zellen fluoreszieren grün, avitale Zellen rot.

Bei den Konstrukten ohne Fibrinkleber, besiedelt mit humanen (Abbildung 29 A-B) und porcinen (Abbildung 29 C-D) Speicheldrüsenzellen, konnte man anhand der HE-gefärbten Kryoschnitte lediglich an der Oberfläche des Konstruktes einige deformierte Zellkerne erkennen. Auch durch eine Erhöhung der Zellzahl von 250.000 auf bis zu 1.000.000 Zellen, die zur Besiedelung auf die Matrix aufgebracht wurde, verbesserte sich das Ergebnis nicht. Bei den Matrices, die davor mit Fibrinkleber behandelt wurden, waren in den HE-gefärbten Schnitten auf der Oberfläche der Matrices einige Zellkerne erkennbar, eingelagert in ein Netz aus Fibrinkleber (Abbildung 29 E-F).

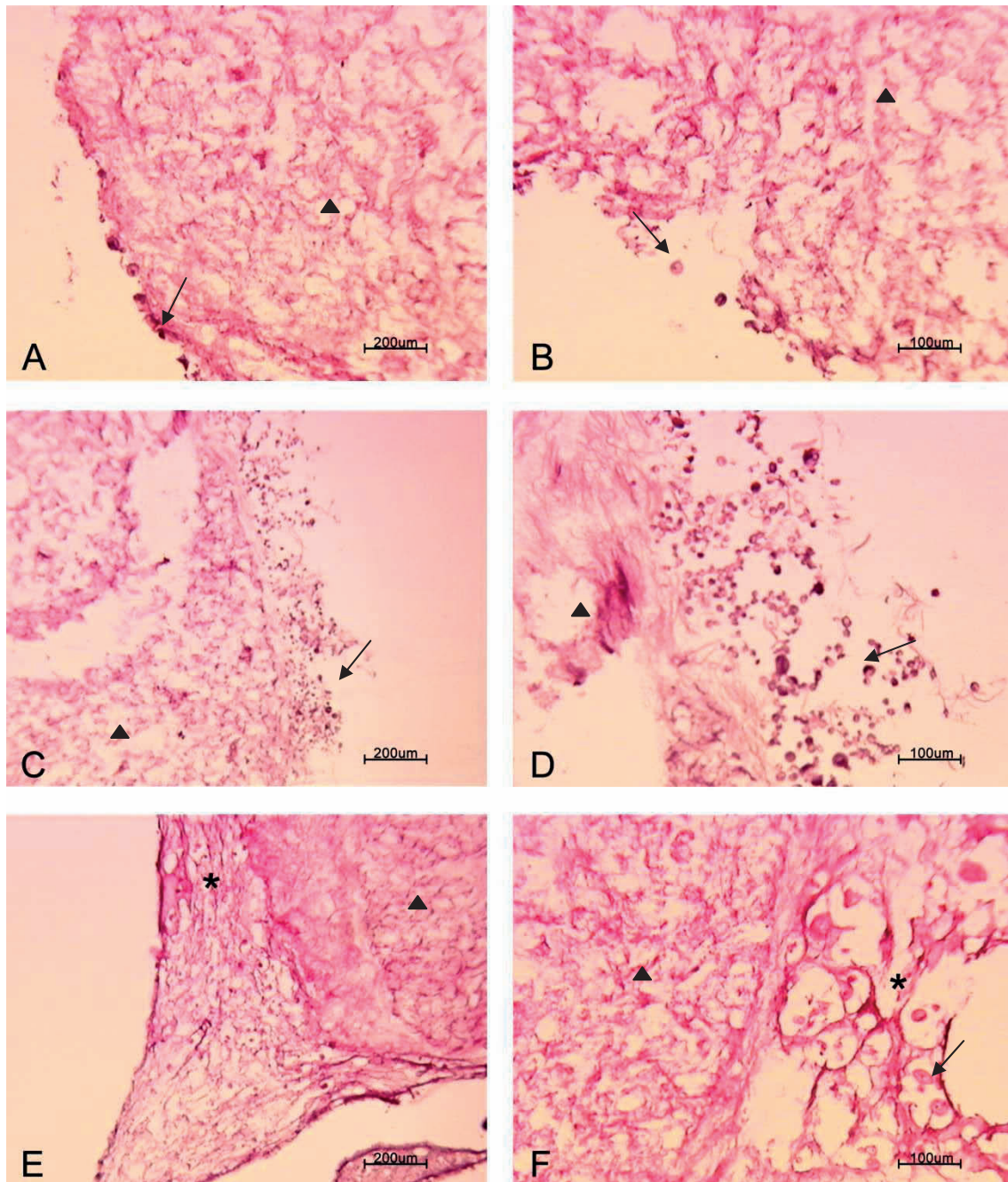


Abbildung 29 HE-Färbung der Konstrukte der Besiedelungsversuche 1-5 (Kapitel 2.9.3) nach 1 Woche Kultivierung, jeweils von zwei unterschiedlichen Stellen auf den Konstrukten. A-B: Besiedelung mit humanen Parotiszellen. C-D: Besiedelung mit porcinen Speicheldrüsenzellen. E-F: Besiedelung mit humanen Parotiszellen und Behandlung der Matrix mit Fibrinkleber, Zellen lagern sich in einem Netz aus Fibrinkleber ein. Dargestellt sind Zellkerne (Pfeil), Matrix (Dreieck) und Fibrinkleber (Stern).

Zur Darstellung der Oberfläche der Konstrukte wurden Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen angefertigt. In Abbildung 30 A erkennt man die Anschnittfläche eines Konstruktes, zuvor besiedelt mit humanen Parotiszellen, welche eine porenreiche Struktur aufwies. Die bindegewebige Kapsel hingegen besaß eine nahezu

glatte Oberfläche. Auf Abbildung 30 B ist ein Abschnitt der Anschnittfläche vergrößert. Es waren keine Zellen vorhanden. Somit ließ sich feststellen, dass sich in den ersten Besiedelungsversuchen keine oder nur ein kleiner Teil der für die Besiedelung aufgetragenen Zellen auf der Matrix niedergelassen hatten.

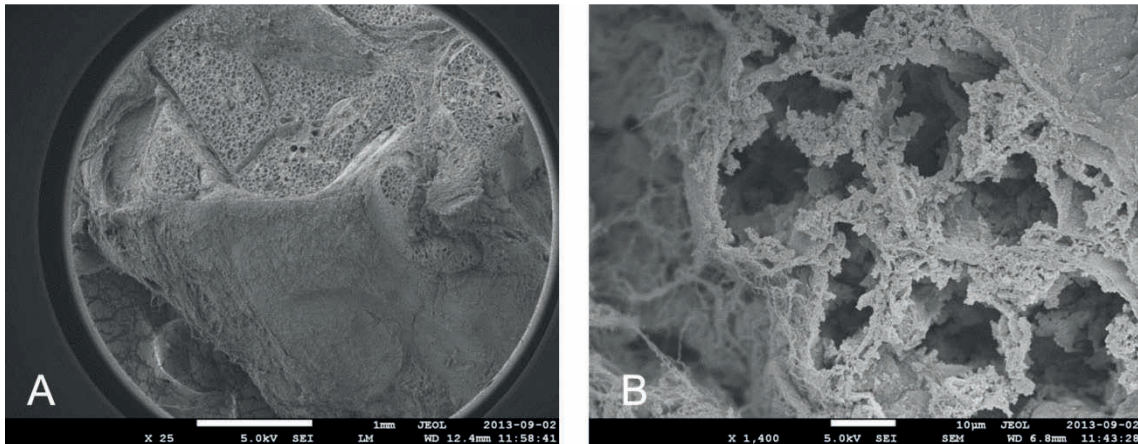


Abbildung 30 Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen eines mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstruktes des Besiedelungsversuches Nr.3 (Kapitel 2.9.3). A: Übersicht der Oberfläche. B: Vergrößerung einer Pore ohne Zellen.

3.3.2 Auswertung der Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Laminin/Fibronektin, Kollagen, Fibroblasten oder Fibrinkleber

Es wurde der Besiedelungsversuch Nr. 6 (Kapitel 2.9.4) ausgewertet. Die FDA/EB-Vitalitätsfärbung der abgeschwemmten Zellen, die sich nach 2 Tagen Kultivierung der Konstrukte auf dem Wellboden befanden, ergab bei der Mehrheit der Zellen eine rote Fluoreszenz (Abbildung 31).

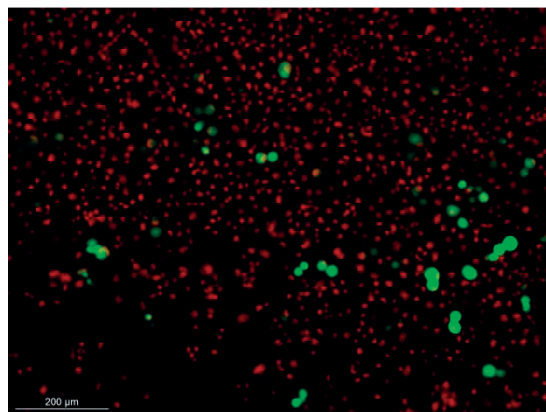


Abbildung 31 FDA/EB-Vitalfärbung der nicht anhaftenden, humanen Parotiszellen des Besiedelungsversuches Nr. 6 (Kapitel 2.9.4) eines Konstruktes ohne Beschichtung, die sich auf dem Wellboden sammelten. Vitale Zellen fluoreszieren grün, avitale Zellen rot.

Auf den HE-gefärbten Kryo- und Paraffinschnitten waren nach einer Woche Besiedelung keine oder nur vereinzelte deformierte Zellkerne auf der Oberfläche der beschichteten und unbeschichteten Konstrukte zu erkennen. Als Beispiel dient die Abbildung 32 A-B von zwei unterschiedlichen Stellen auf dem Konstrukt.

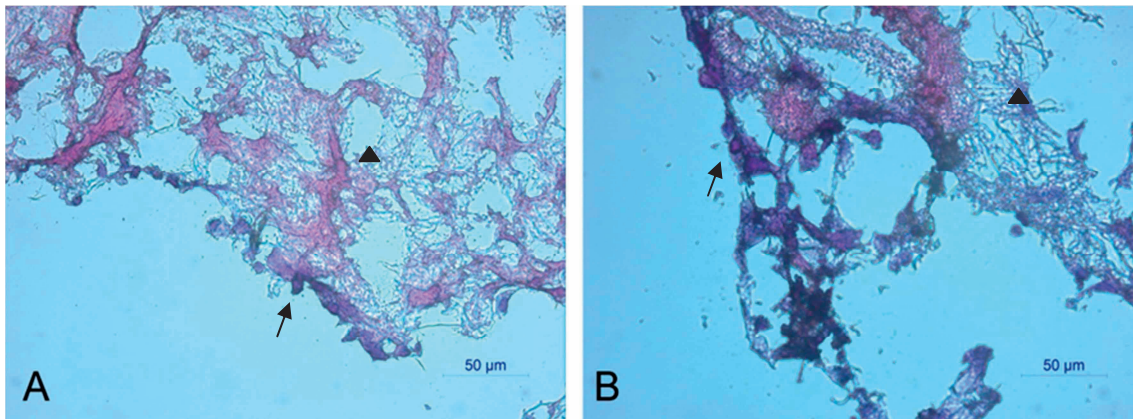


Abbildung 32 HE-Färbung des mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstruktes des Besiedelungsversuches Nr.6 (Kapitel 2.9.4) ohne Beschichtung nach 1 Woche Kultivierung von zwei unterschiedlichen Stellen. A-B: Einzelne Zellen auf der Konstruktoberfläche. Dargestellt sind Zellkerne (Pfeil) und Matrix (Dreieck).

Um die Adhärenz der humanen Parotiszellen nach einer Woche der Besiedelung auf den Konstrukten zu überprüfen, wurde der DAPI-Farbstoff verwendet. Anhand der Fluoreszenz der Zellkerne konnte man erkennen, dass die Besiedelung auf der Oberfläche der Konstrukte erfolgreich war. Abbildung 33 A-B zeigt multiple, blau angefärbte Zellkerne als Hinweis für eine Adhärenz der humanen Parotiszellen auf der Konstruktoberfläche.

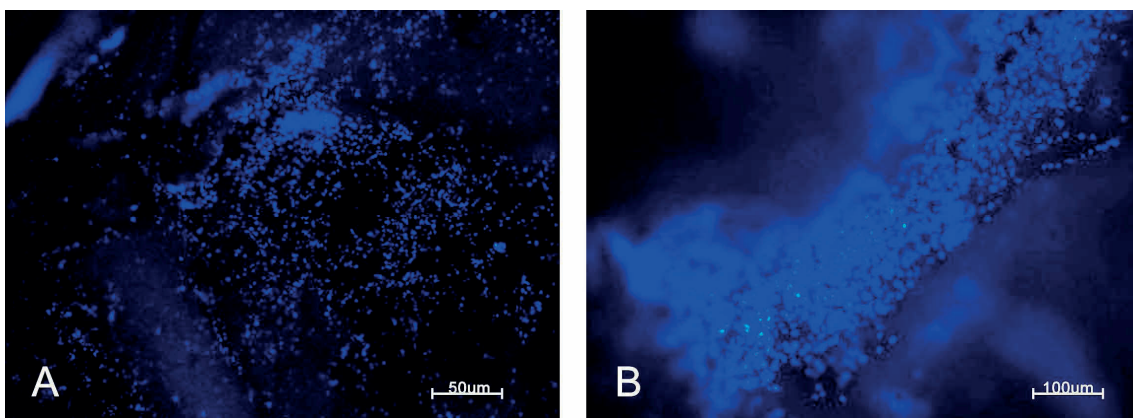


Abbildung 33 DAPI-Färbung des mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstruktes des Besiedelungsversuches Nr. 6 (Kapitel 2.9.4) ohne Beschichtung nach 1 Woche Kultivierung, Zellkerne fluoreszieren blau. A: Zellen sind über die gesamte Oberfläche des Konstruktes verteilt. B: Übereinandergelagerte Zellen auf der Oberfläche des Konstruktes.

Auf den Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen der Konstrukte ohne Beschichtung waren kugelförmige Zellen (Abbildung 34 A) und Zellen mit einer flacher werdenden Oberfläche auf der Matrix zu erkennen, die eine bessere Adhärenz zur Oberfläche des Konstruktes bildeten (Abbildung 34 B). Die Zellen lagerten sich hauptsächlich in den Poren der Anschnittfläche der Matrix ein. Die mit Kollagen vorbehandelten Konstrukte zeigten ebenfalls kugelförmige Zellen mit glatter Oberfläche (Abbildung 34 C), die sich hauptsächlich in den Poren der Anschnittfläche der Matrix befanden (Abbildung 34 D).

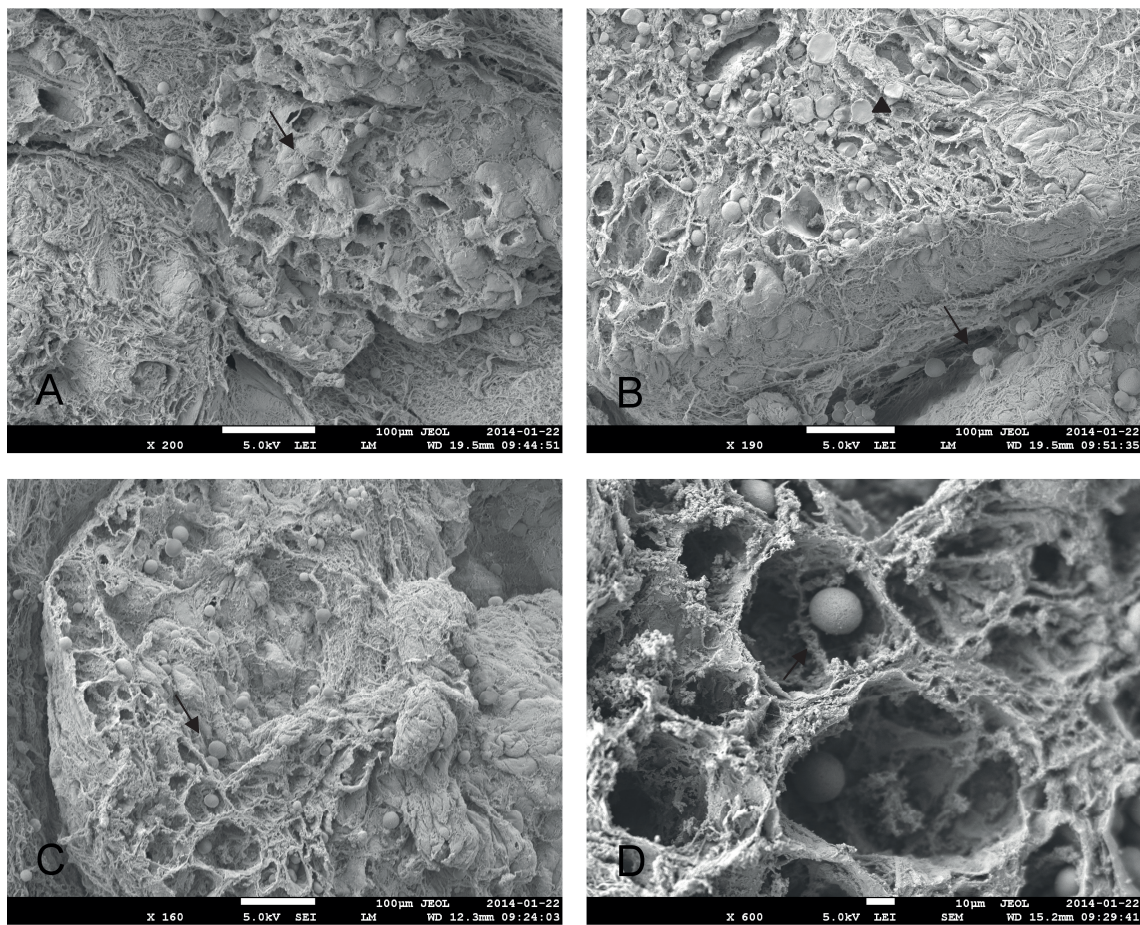


Abbildung 34 Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen der mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstrukte des Besiedelungsversuches Nr. 6 (Kapitel 2.9.4) von jeweils zwei unterschiedlichen Stellen auf der Oberfläche. A-B: Ohne Beschichtung. A: Kugelförmige Zellen in den Poren der Anschnittfläche. B: Zellen mit kugelförmiger und flacher Oberfläche. C-D: Beschichtung mit Kollagen. C: Kugelförmige Zellen, hauptsächlich in den Poren der Anschnittfläche zu erkennen. D: Vergrößerung einzelner Poren mit eingelagerten, kugelförmigen Zellen. Dargestellt sind humane Parotiszellen mit kugelförmiger (Pfeil) und flacher Oberfläche (Dreieck).

Erst die Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen der Konstrukte, die vor der Besiedelung mit Fibroblasten, Fibronectin/Laminin oder Fibrinkleber behandelt wurden, wiesen deutliche Unterschiede auf. Abbildung 35 A zeigt die Oberfläche eines zuvor mit Fibroblasten besiedelten Konstruktes. Es ist ein Geflecht aus dünnen Strängen zu erkennen, das einen Großteil der Oberfläche bedeckte. Runde Zellen waren darin eingelagert (Abbildung 35 B). Abbildung 35 C-D zeigt ein mit Laminin/Fibronectin vorbehandeltes Konstrukt. Nicht nur in den Poren, sondern auch auf der Bindegewebskapsel waren kugelförmige Zellen zu erkennen. Einige passten sich durch eine flache Form der Oberfläche an und bildeten eine bessere Adhäsion zur Matrix aus. In Abbildung 35 E-F wurde die Oberfläche der Matrix vor der Besiedelung mit Fibrinkleber behandelt. Der Fibrinkleber bildete eine die Oberfläche umschließende Schicht (Abbildung 35 E), auf der wenig kugelförmige Zellen erkennbar waren (Abbildung 35 F).

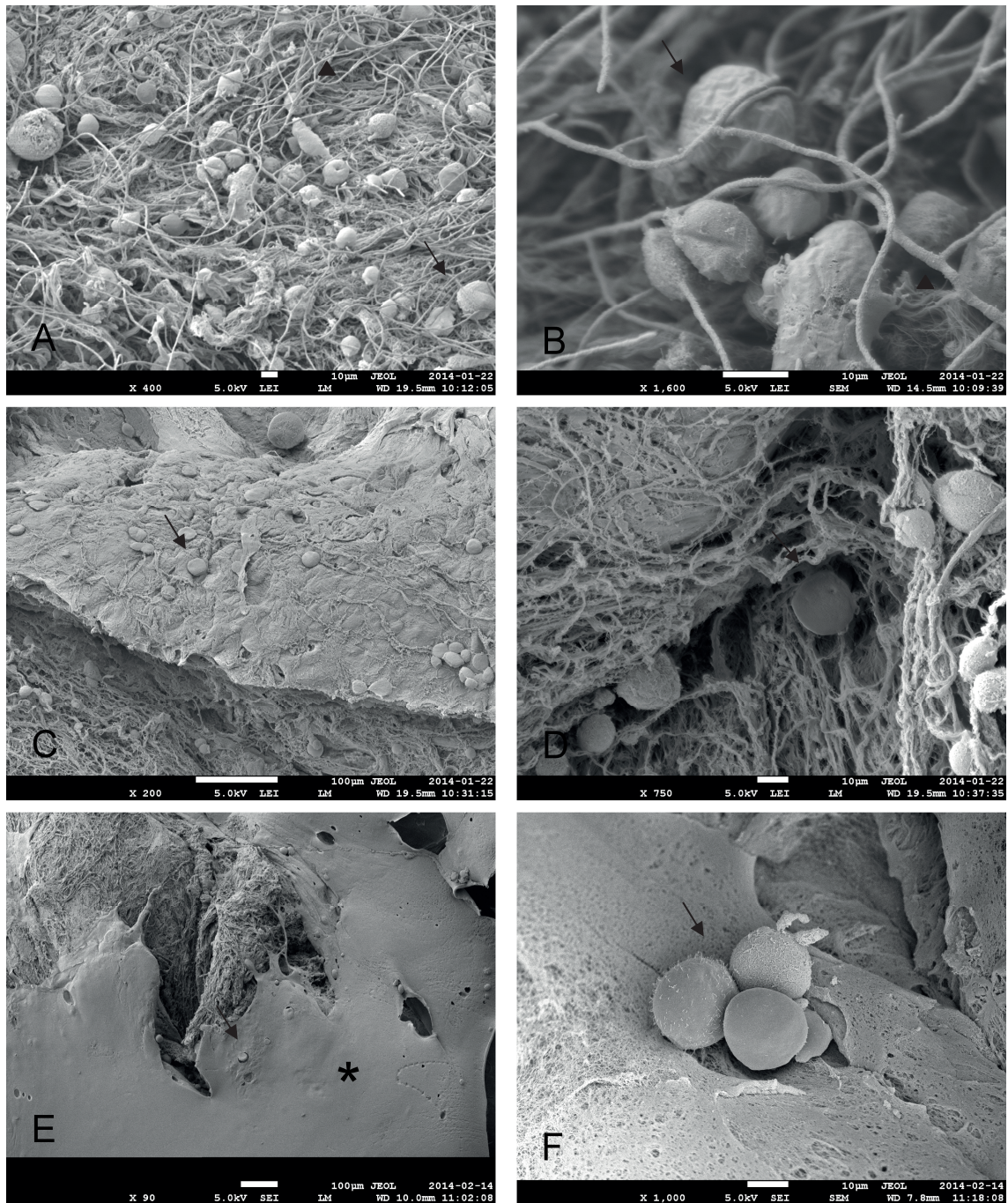


Abbildung 35 Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen der mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstrukte des Besiedelungsversuches Nr. 6 (Kapitel 2.9.4) nach 1 Woche Kultivierung von jeweils zwei unterschiedlichen Stellen auf der Oberfläche der Konstrukte. A-B: Beschichtung mit Fibroblasten. A: Kugelförmige Zellen, eingelagert in ein Geflecht aus dünnen Strängen. B: Einzelne, kugelförmige Zellen in einem Geflecht von Strängen. C-D: Beschichtung mit Laminin/Fibronectin. C: Kugelförmige bis flache Zellen, in den Poren und auf der glatten Oberfläche des Konstruktes erkennbar. D: Einzelne, kugelförmige Zellen. E-F: Beschichtung mit Fibrinkleber. E: Einzelne, kugelförmige Zellen auf und unter der mit einer glatten Schicht aus Fibrinkleber überzogenen Oberfläche. F: Einzelne, kugelförmige Zellen. Dargestellt sind humane Parotiszellen (Pfeil), dünne Stränge (Dreieck) und Fibrinkleber (Stern).

3.3.3 Auswertung der Besiedelungsversuche mit und ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Hydrogel

Es wurden die Besiedelungsversuche Nr.7+8 (Kapitel 2.9.5) ausgewertet. Die FDA/EB-Vitalfärbung der Zellen der Besiedelungsversuche 7+8, die sich nach 2 Tagen Kultivierung der Konstrukte auf dem Wellboden befanden, ergab bei der Mehrheit der Zellen eine grüne Fluoreszenz (Abbildung 36).

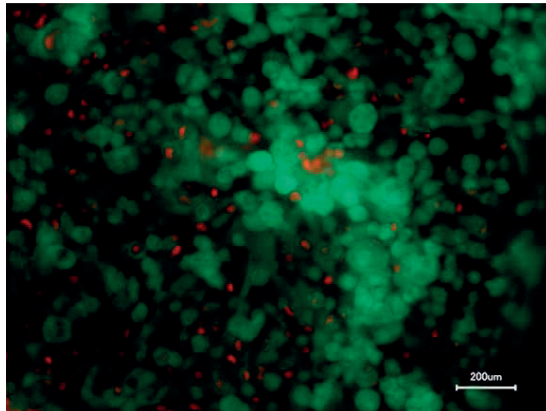


Abbildung 36 FDA/EB-Vitalfärbung der nicht anhaftenden, humanen Parotiszellen des Besiedelungsversuches Nr. 8 (Kapitel 2.9.5), die sich auf dem Wellboden sammelten. Vitale Zellen fluoreszieren grün, avitale Zellen rot.

Auf den mit HE-gefärbten Paraffinschnitten der Konstrukte nach 1 Woche Kultivierung waren an wenigen Stellen humane Parotiszellen zu erkennen, die auf der Oberfläche adhärten und eine Zellschicht bildeten (Abbildung 37 A-B). Einige humane Parotiszellen waren auch im Inneren der Matrix zu erkennen (Abbildung 37 A) und bildeten azinusförmige Strukturen. Abbildung B zeigt übereinandergelagerte Zellen auf der Oberfläche des Konstruktes. Die HE-gefärbten Paraffinschnitten der Konstrukte nach 3 Wochen Kultivierung ließen keine Proliferation der humanen Parotiszellen auf der Oberfläche der Konstrukte erkennen. Die HE-gefärbten Paraffinschnitte der Konstrukte, beschichtet mit Hydrogel, zeigten nur sehr vereinzelt Zellen. Im Inneren der Matrix waren keine Zellen zu erkennen.

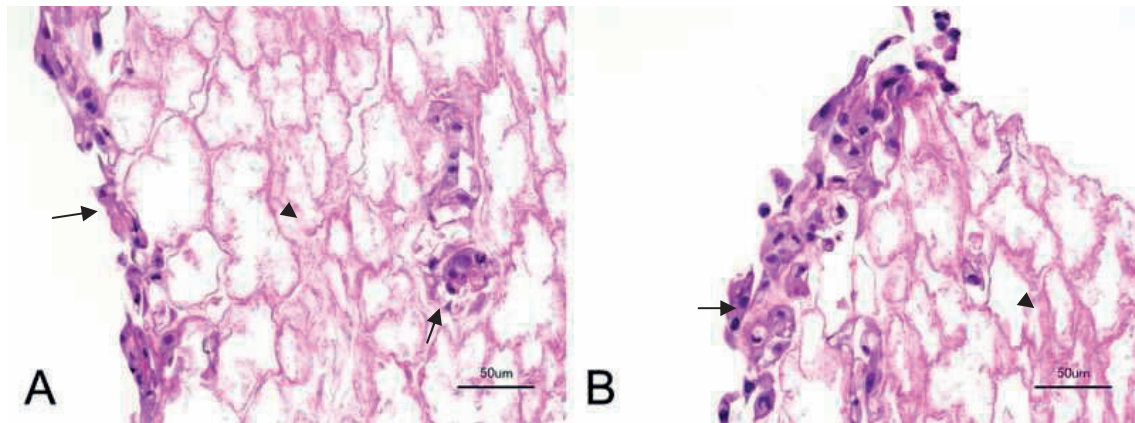


Abbildung 37 HE-Färbung des mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstruktes des Besiedelungsversuches Nr.8 (Kapitel 2.9.5) ohne Beschichtung nach 1 Woche Kultivierung von zwei unterschiedlichen Stellen. A: Zellen auf der Oberfläche und im Inneren des Konstruktes. B: Übereinandergelagerte Zellen auf der Oberfläche des Konstruktes. Dargestellt sind Zellkerne (Pfeil) und Matrix (Dreieck).

Die Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen zeigten Unterschiede auf zwischen den mit und ohne Hydrogel beschichteten Oberflächen der Konstrukte (Abbildung 38) nach 1 Woche Kultivierung. Auf den Abbildungen 38 A-B eines unbeschichteten Konstruktes war ein sich über die gesamte Oberfläche ausgebreiteter Zellrasen (Abbildung 38 A-B) zu erkennen. Die Zellen hatten eine abgeflachte Oberfläche und bildeten dadurch eine gute Adhärenz zur Oberfläche der Matrix aus. Zum Teil wuchsen die Zellen mehrschichtig übereinander und waren sehr schwer voneinander abzugrenzen (Abbildung 38 A). Durch ihre deutlich ausgeprägten Zellfortsätze standen sie in Verbindung zur Matrix und zu den Nachbarzellen (Abbildung 38 B). Die Abbildungen 38 C-D zeigten zwei Stellen auf der Oberfläche eines zuvor mit Hydrogel beschichteten Konstruktes. Man erkennt in Abbildung 38 C nahezu auf der kompletten Oberfläche der Matrix eine glatte Schicht aus Hydrogel, auf der sich einige kugelförmige Zellen befanden. Die Zellen bildeten keine gute Adhärenz zur Matrixoberfläche und zu Nachbarzellen aus. Abbildung 38 D zeigt kugelförmige Zellen, die unter der Schicht aus Hydrogel zu erkennen sind.

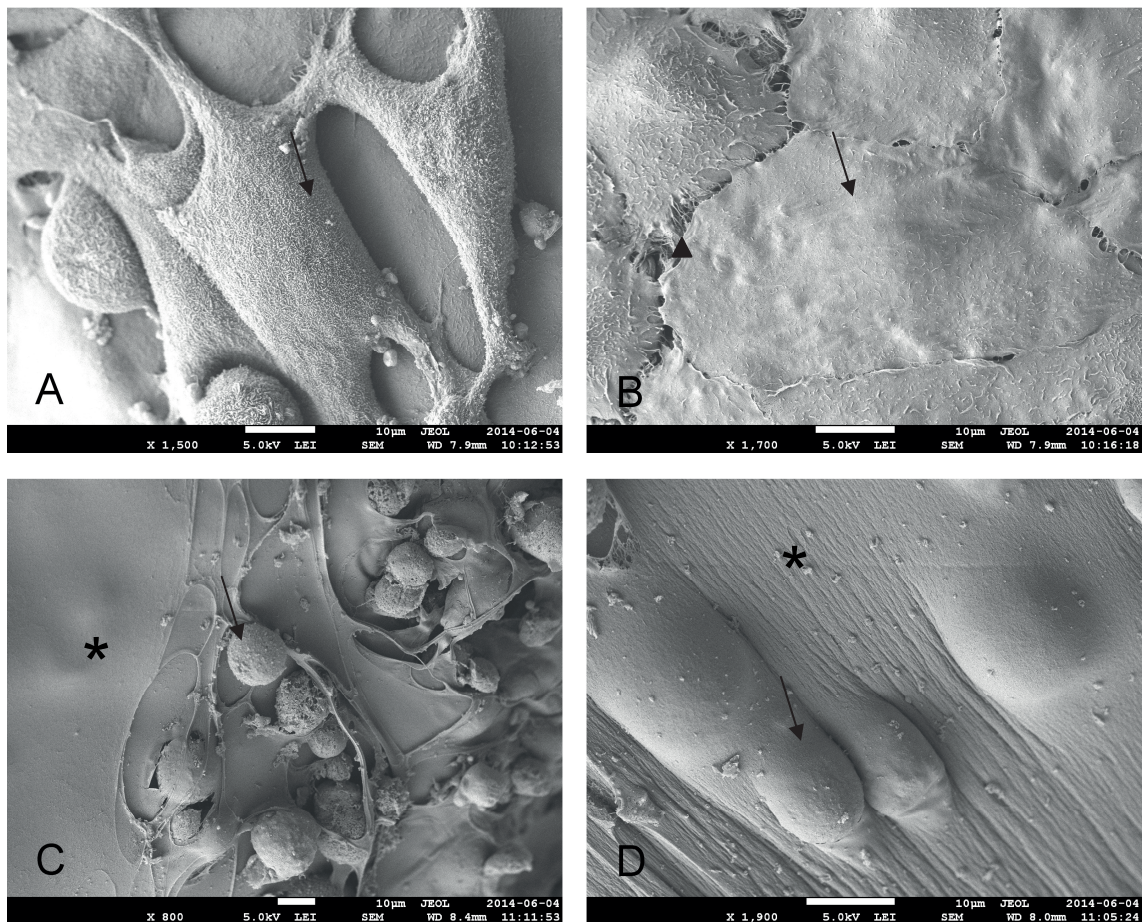


Abbildung 38 Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen der mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstrukte des Besiedelungsversuches Nr. 7 (A-B)+8 (C-D), (Kapitel 2.9.5) nach 1 Woche Kultivierung von jeweils zwei unterschiedlichen Stellen auf der Oberflächen der Konstrukte. A-B: Keine Beschichtung. A: Mehrschichtige Anordnung der Zellen übereinander mit Ausbildung von Zellfortsätzen. B: Zellen mit flacher Oberfläche, die Zellfortsätze zu den Nachbarzellen bildeten. C-D: Beschichtung mit Hydrogel. C: Auf der Hydrogelschicht befanden sich kugelförmige Zellen. D: Kugelförmige Zellen, von Hydrogel bedeckt. Dargestellt sind humane Parotiszellen (Pfeil), Zellfortsätze (Dreieck) und Hydrogel (Stern).

In Abbildung 39 sind Transmissionselektronenmikroskopiebilder der Konstrukte aus dem Besiedelungsversuch Nr. 8 (Kapitel 2.9.5) ohne Beschichtung der Matrixoberfläche mit Hydrogel nach 1 Woche Kultivierung dargestellt. Es wurden humane Parotiszellen auf den Konstrukten ausfindig gemacht und nach ihrer Vitalität beurteilt. Abbildung 39 A-C zeigt einzelnen Zellen auf der Oberfläche der Konstrukte, die Zellkontakte zur Matrix und zu Nachbarzellen ausbildeten. Sie wiesen einen runden, zentral gelegenen Kern und kleine Vesikel im Zytoplasma auf. Auf der Abbildung 39 D erkennt man die innere Struktur der Matrix. Man fand darin keine vitalen Zellen vor.

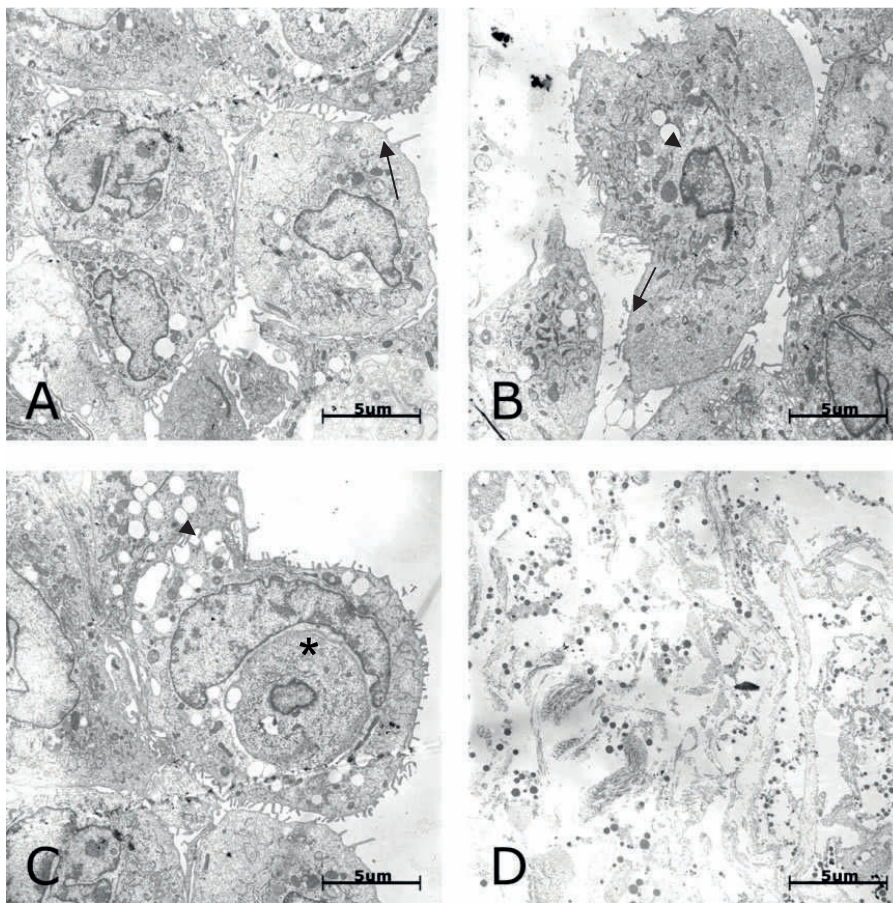


Abbildung 39 Transmissionselektronenmikroskopieaufnahmen der mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstrukte des Besiedelungsversuches Nr. 8 (Kapitel 2.9.5) ohne Beschichtung nach 1 Woche Kultivierung. A: Einzelne Zellen auf der Oberfläche des Konstruktes, die Zellfortsätze ausbildeten und kleine Vesikel im Zytoplasma beinhalten. B: Einzelne, vergrößerte Zelle mit wenig Vesikeln im Zytoplasma. C: Einzelne, vergrößerte Zelle mit vielen Vesikeln im Zytoplasma. D: Innere Struktur der Matrix ohne Zellen. Dargestellt sind Zellfortsätze (Pfeil), kleine Vesikel (Dreieck) und Zellkern (Stern).

Um die Vitalität der Zellen auf den Konstrukten im Besiedelungsversuch 7+8 über einen Zeitraum von 3 Wochen zu beurteilen, wurden die Konstrukte am Tag 7, 14 und 21 mit der FDA/EB-Vitalfärbung (Kapitel 2.10.1) behandelt. In Abbildung 40 A-F ist zu erkennen, dass sich sehr viele Zellen auf den Konstrukten befinden und die Mehrheit dieser Zellen auch nach 3 Wochen Kultivierung grün fluoreszierte. Es gab keinen Vitalitätsunterschied hinsichtlich der Besiedelung mit und ohne Hydrogel. In Abbildung 40 E-F lagerten sich einige Zellen auf der Oberfläche der Konstrukte zusammen und bildeten azinüsartige Strukturen aus.

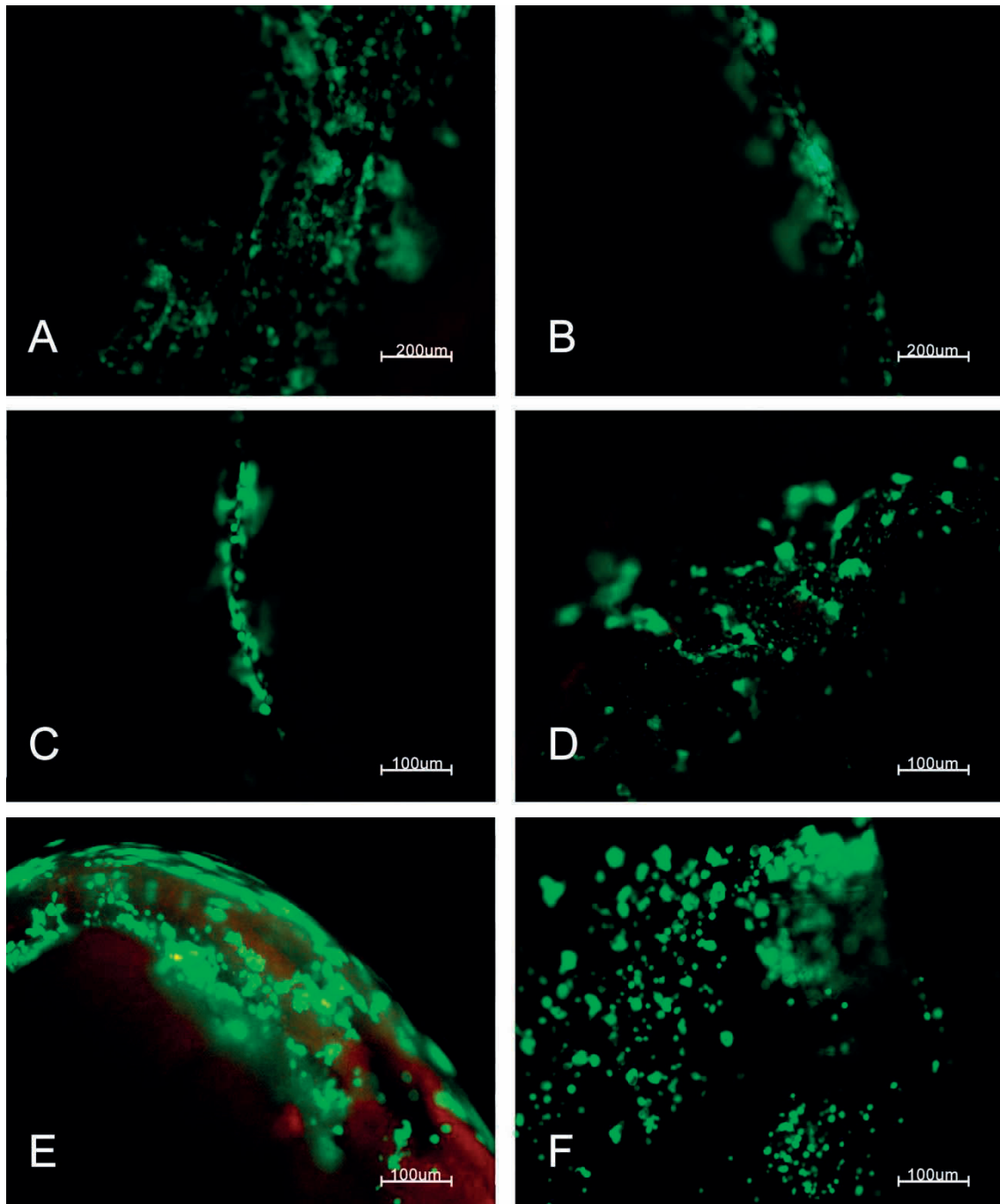


Abbildung 40 FDA/EB-Vitalfärbung der mit humanen Parotiszellen besiedelten Konstrukte des Besiedelungsversuches Nr. 7+8 (Kapitel 2.9.5).
Linke Spalte: Besiedelungsversuch ohne Hydrogel.
Rechte Spalte: Besiedelungsversuch mit Hydrogel.
Vitale Zellen fluoreszieren grün, avitale Zellen rot. A-B: Tag 7 der Besiedelung. C-D: Tag 14 der Besiedelung. E-F: Tag 21 der Besiedelung.
Auf allen Bildern fluoresziert die Mehrheit der über die Oberfläche verteilten Zellen grün.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es gelang, humane und porcine Speicheldrüsenzellen bis Passage 3 *in vitro* von verschiedenen Patienten und Schweinen zu kultivieren und ihre Vitalität zu erhalten. Die humanen Parotiszellen wurden in 2-dimensionaler Monokultur auf ihre Produktion von α -Amylase, Cytokeratin und Aquaporin 5 molekularbiologisch und immunhistologisch untersucht. Auf die Frage, ob sie ihre charakteristischen Eigenschaften beibehalten, konnte eine konstante Produktion von α -Amylase, Cytokeratin und Aquaporin 5 über die Passagen gezeigt werden. Cytokeratin wurde am stärksten exprimiert, gefolgt von α -Amylase. Aquaporin 5 war hingegen nicht oder nur sehr schwach vorhanden. Zudem wurde die porcine Speicheldrüse erfolgreich dezellularisiert, was durch die Feulgen-Färbung und durch die Bestimmung des restlichen DNA-Gehalts mit dem Quanti-It™PicoGreen®ds DNA Assay bestätigt wurde. Die Frage, wie Speicheldrüsenzellen die dezellularisierte, porcine Speicheldrüse annehmen, lieferte verschiedene Ergebnisse je nach Ausführung des Besiedlungsprotokolls. Die ersten Besiedelungsversuche mit humanen Speicheldrüsenzellen waren ohne Erfolg. Die Zellen nahmen die Oberfläche der Matrix nicht an und sammelten sich auf dem Wellboden. Durch die FDA/EB-Vitalfärbung wurde ein Absterben der Zellen nach Kontakt mit der Matrix sichtbar gemacht. Durch den Gallensäuretest wurden Reste von Desoxycholsäure im PBS-Überstand nachgewiesen, in der die Matrices nach ihrer Dezellularisierung aufbewahrt wurden. Vor den nächsten Besiedelungsversuchen wurden die Matrices über 1 Woche jeden 2. Tag in PBS gewaschen, um Reste von Desoxycholsäure zu entfernen. Zudem wurde die Inkubationszeit der Zellen, die auf die Matrices pipettiert wurden, von 15 min auf 2 h verlängert. Die Zellen, die auf der Oberfläche der Matrices adhärten, hatten eine kugelige Form und bildeten keine Zellfortsätze zu Nachbarzellen oder der Matrix aus. Vor den letzten Besiedelungsversuchen wurden die Matrices über 3 Wochen alle 2-3 Tage mit PBS gewaschen. Auf den HE-Färbungen der Paraffinschnitte dieser Konstrukte waren einige Zellkerne auf der Oberfläche und im Inneren der Matrix zu erkennen. Auf den Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen wurden flache, humane Parotiszellen auf den Konstrukten sichtbar gemacht, die auf der Oberfläche der Matrix adhärten und Zellfortsätze zur Matrix und zu Nachbarzellen eingingen. Zur Frage der Vitalität der anhaftenden, humanen Parotiszellen auf den Matrices wurden nach 7, 14 und 21 Tagen der Kultivierung der Konstrukte des Besiedelungsversuches Nr. 7 + 8 FDA/EB-Vitalfärbung ausgeführt, die bei der Mehrheit der Zellen eine grüne Fluoreszenz ergaben und somit vital waren.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit soll ein neuer Weg zur Generierung einer artifiziellen Speicheldrüse aufgezeigt werden. Als ersten Schritt wurden primäre, adhärenente Speicheldrüsenzellen aus kleinen Gewebestückchen gewonnen, über mehrere Passagen kultiviert und charakterisiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und auf eine Matrix aus dezellularisierter, porciner Speicheldrüse aufgebracht, um anschließend nach 1-3 Wochen Kultivierung ihr Wachstum anhand Elektronenmikroskopieaufnahmen und histologischen Schnitten zu überprüfen.

4.1 Tissue Engineering

Das Ziel beim Tissue Engineering ist es, die anatomische Struktur und Funktion von geschädigtem Gewebe und zerstörten Organen durch Transplantate, die außerhalb des Körpers gewachsen sind, zu ersetzen (Schenke-Layland, 2011). Hierfür kommen Prinzipien der Ingenieur- und Biowissenschaft zum Einsatz (Vacanti et al., 1999). Die Transplantate bestehen aus 3-dimensionalen, funktionellen Geweben aus körpereigenen Zellen. Sowohl Mediziner und Biologen, die ihr Wissen über die Physiologie, Isolation und Kultivierung der Zellen einbringen, als auch Chemiker und Materialwissenschaftler, die die Trägermaterialien herstellen, arbeiten zusammen, um das beste Ergebnis zu erreichen.

Das Prinzip des Tissue Engineerings beruht auf mehreren Schritten. Zuerst werden primäre Zellen kultiviert. Dabei wird versucht, ihre funktionellen Eigenschaften möglichst beizubehalten. Als nächstes wird ein 3-dimensionales, biologisches oder synthetisches Trägermaterial mit den kultivierten Zellen besiedelt. Es erfolgt die weitere Kultivierung, bis das Konstrukt zur Transplantation oder als Testsystem dienen kann. Da die Matrices mit autologen Zellen besiedelt werden, rufen sie bei Transplantation keine Abstoßungsreaktion beim Patienten durch das Immunsystem hervor (Wallis et al., 2004). Es müssen somit keine immunsuppressiven Medikamente eingenommen werden.

Als erfolgreiches Beispiel kann hier die Dezellularisierung von porcinen Pulmonalklappen des Herzens aufgeführt werden, die in Merinoschafe implantiert wurden. Nach 6-12 Monaten fand eine *in vivo* Re-Besiedelung der dezellularisierten, xenogenen Herzklappen mit klappenspezifischen Zellen statt. Die Funktion der Klappen konnte erhalten bleiben (Leyh et al., 2003). Außerdem wurden

dezellularisierte, porcine Herzklappen und Dünndarmsubmukosa (Small Intestinal Submucosa, SIS)-Matrix schon mit Erfolg in den humanen Empfänger transplantiert (Badylak, 2005). Erst kürzlich wurden aus dezellularisierter, porciner SIS-Matrix Vaginas für die Transplantation an 4 Patientinnen geformt, die unter kongenitaler Vaginalaplasie litten. Die von den Patientinnen gewonnenen Epithelzellen und glatten Muskelzellen wurden kultiviert und zur Re-Besiedelung der Matrix verwendet. Die Transplantation war erfolgreich (Raya-Rivera et al., 2014).

4.2 Dezellularisierung von Organen und Geweben

Es wurden schon verschiedene Protokolle zur Dezellularisierung von Geweben und Organen eingesetzt (Arenas-Herrera et al., 2013). Wichtig für eine erfolgreiche Dezellularisierung ist die Auswahl der Dezellularisierungsmittel, die für jedes Organ und Gewebe angepasst werden muss. Wirkstoffe wie Triton X, Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) und Natriumdesoxycholat werden einzeln oder in Kombination angewendet. Zelluläre Dichte, spezifische Dichte, Lipidgehalt und Schichtdicke des Gewebes spielen dabei eine wichtige Rolle. Da die Dezellularisierungslösungen die Struktur und Zusammensetzung der EZM schädigen können (Badylak et al., 2011), muss ihre Dosierung und Konzentration für jedes Gewebe und Organ angepasst werden. Die EZM ist das Bindegewebesgerüst, was nach der Entfernung von zellulärem Material durch die Dezellularisierung erhalten bleiben sollte (Gilbert, 2012).

Für die homogene und effektive Dezellularisierung kompletter Organe ist ein perfusions-basierendes Dezellularisierungssystem notwendig, das die Dezellularisierungslösung durch das vaskuläre Netzwerk des betreffenden Organs pumpt (Song et al., 2011). Die Perfusionsdezellularisierung wurde 2008 das erste Mal an einem Nager-Herz beschrieben (Ott et al., 2008). Des Weiteren gelang es, das Herz (Wainwright et al., 2010), die Leber (Baptista et al., 2011), die Lunge (Ott et al., 2010) und die Niere (Ross et al., 2009) von verschiedenen Tierarten wie Schwein, Ratte, Frettchen, Kaninchen und Maus über das organeigene Gefäßsystem mit unterschiedlichen Dezellularisierungslösungen von Zellen und DNA-Resten zu befreien. Im Ott Labor für Organ-Engineering und Regenerativer Medizin in Boston wurden komplette, humane Herzen, die für die Transplantation nicht mehr geeignet waren, mit Erfolg dezellularisiert (Guyette et al., 2016).

Das Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB in Stuttgart und auch der Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Heike Walles forschen an der Herstellung von biologischen Matrices. Ein Projekt befasst sich eingehend mit der Dezellularisierung von porcinem Jejunum. An dem Dezellularisierungsprotokoll der Arbeitsgruppe um Mertsching (Mertsching et al., 2009) orientiert sich auch die Dezellularisierungsmethode der porcinen Speicheldrüsenstücke mit einigen Modifikationen. Bei dem porcinen Jejunumstück wird der arterielle Gefäßstiel freipräpariert und an ein rückführendes Perfusionssystem angeschlossen. Durch dieses System wird 4%ige Natriumdesoxycholatlösung 75 min mit einer Geschwindigkeit von 2,3 ml/min perfundiert. Anschließend findet eine Perfusion mit PBS über 75 min mit einem Druck von 80-100 mm Hg statt, um restliche Natriumdesoxycholatlösung und Zellreste bei 3,9 ml/min herauszuspülen. Das dezellularisierte, porcine Jejunumstück wird in DNase I-Lösung bei Raumtemperaturen über Nacht inkubiert. Es erfolgt eine 7-malige Spülung über jeweils 4 h mit 4°C kaltem PBS, um chemische Rückstände zu entfernen. Die porcinen Speicheldrüsenstücke wurden in die Natriumdesoxycholatlösung gelegt, anschließend mit PBS gespült und eine Nacht in DNase I-Lösung inkubiert. Da es sich um kleine Gewebestücke und nicht um ein kompletten Organ handelte, war zur effektiven und vollständigen Dezellularisierung kein perfusions-basiertes Dezellularisierungssystem notwendig.

4.3 Charakterisierung von dezellularisierter, porciner Speicheldrüse

4.3.1 Dezellularisierungserfolg des porcinen Speicheldrüsengewebes

Da DNA-Reste den Re-Besiedlungserfolg beeinflussen können, sollte so wenig wie möglich an Zellresten nach der Dezellularisierung vorhanden sein. Außerdem ist fremde DNA bei Transplantationen ein Nachteil, da sie eine Immunabwehrreaktion hervorrufen kann (Barber, 2011). Nach der Dezellularisierung von kompletten, humanen Herzen wurde eine Reduktion von 99,05% der DNA erzielt (Guyette et al., 2016). Der Dezellularisierungserfolg der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke wurde histologisch anhand der Feulgenfärbung und mit dem Quanti-iT™PicoGreen®dsDNA Assay überprüft. Ein zufriedenstellendes Ergebnis von unter 1 ng DNA in 1 mg Trockengewicht wurde erreicht. Nach einer erfolgreichen Dezellularisierung sollte weniger als 50 ng DNA in 1 mg Trockengewicht enthalten sein (Crapo et al., 2011). Ziel ist es, alle zellulären Bestandteile zu entfernen, ohne den Aufbau, die biologische Aktivität oder die mechanische Intaktheit der 3-dimensionalen

Matrix zu beeinflussen. Eine Regel bei der Dezellularisierung lautet, nur so wenig wie möglich Natriumdesoxycholat einzusetzen, um Schäden des Aufbaus der Ultrastruktur der Matrix so gering wie möglich zu halten (Badylak et al., 2011). Die Arbeitsgruppe um Gilbert konnte zeigen, dass sich in den meisten dezellularisierten Geweben von verschiedenen Spezies noch restliche DNA befand (Gilbert et al., 2009). Da das vorliegende Ergebnis unter 1 ng DNA in 1 mg Trockengewicht lag, wäre eine Anpassung des Dezellularisierungsprogrammes denkbar, um den Einsatz von Natriumdesoxycholat zu reduzieren und dadurch die EZM weniger zu schädigen, um einen besseren Besiedlungserfolg zu erzielen.

4.3.2 Bewertung des Gallensäuretests

Wichtig für die Re-Besiedelung der dezellularisierten Geweben und Organen ist das vollständige Herausspülen der Dezellularisierungslösungen. So wurden nach der perfusions-basierten Dezellularisierung von humanen Herzen keine messbaren Mengen von restlichem SDS nachgewiesen (Guyette et al., 2016). Da die zurechtgeschnittenen, porcinen Speicheldrüsenstücke für die Dezellularisierung nicht über einen freipräparierten Gefäßstiel an einen Perfusionskreislauf angeschlossen waren, konnte die Natriumdesoxycholatlösung im Gegensatz zur Dezellularisierung von porcinem Jejunumsegment (Mertsching et al., 2009) nicht über Druck herausgespült werden. Die Natriumdesoxycholatlösung wurde nur durch Inkubation der porcinen Speicheldrüsenstücke in PBS entfernt. Nach der Behandlung mit DNase-I-Lösung erfolgte zwar eine mehrmalige Waschung in PBS. Doch der Gallensäuretest nach der Gammasterilisation zeigte erhöhte Werte von verbliebener Desoxycholsäure in der PBS-Lösung auf, in der die dezellularisierten Speicheldrüsenstücke bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt wurden. Da bei den ersten Besiedelungsversuchen die Zellen an der Oberfläche kugelige Formen bildeten und viele der nicht-adhärierenden Zellen auf dem Boden der Wellplatte nicht mehr vital waren, weist dies auf eine toxische Wirkung des verbliebenen Natriumdesoxycholat auf die Zellen hin. Bei den letzten Besiedelungsversuchen Nr. 8-9 (Kapitel 2.9.5) konnte durch mehrmaliges Waschen der Matrices über 3 Wochen ein Herausspülen der Natriumdesoxycholatlösung und dadurch bessere Besiedlungsergebnisse erzielt werden.

Eine Möglichkeit für die bessere Auswaschung der Natriumdesoxycholatlösung wäre die Dezellularisierung einer kompletten, porcinen Speicheldrüse. Der Gefäßstiel müsste freipräpariert und an ein Perfusionssystem angeschlossen werden. So könnte restliche Natriumdesoxycholatlösung über Druck besser herausgespült werden.

4.3.3 Charakterisierung der extrazellulären Matrix

Trägermaterialien, sogenannte Matrices, die im Tissue Engineering eingesetzt werden, sollten gewisse Anforderungen erfüllen. Die Arbeitsgruppe um O'Brian beschrieb diese in mehreren Punkten: Die Matrix sollte biokompatibel sein, d. h. die Zellen sollten auf der Matrix anhaften, ihre charakteristischen Eigenschaften beibehalten, auf der Zelloberfläche oder durch sie hindurch wandern, proliferieren und neue EZM bilden. Die Matrix sollte nur eine vernachlässigbare Immunreaktion auslösen. Sie sollte bioabbaubar sein und durch Zellen und ihre neugebildete EZM ersetzt werden. Außerdem sollte die Matrix die gleichen mechanischen Eigenschaften haben wie das Gewebe, welches ersetzt werden soll. Sie sollte interkonnektive Poren aufweisen, damit die Zellen sich darin anlagern und nach innen wachsen können. Durch die Interkonnektivität werden die Zellen mit Nährstoffen versorgt und Stoffwechselprodukte können an die Oberfläche transportiert werden. Um sie kostengünstig anfertigen zu können, sollte die Matrix als Kleinserie produzierbar sein (O'Brian et al. 2011).

Im Tissue Engineering kommt immer mehr natürliche EZM als Trägermaterial zum Einsatz. Die EZM wird von den ortsansässigen Zellen gebildet und ist zusammengesetzt aus Strukturproteinen wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, Elastin und Funktionsproteinen wie Wachstumsfaktoren (growth factors) und bioaktiven Peptiden. Außerdem sind Glykoproteine und Glykosaminoglykane enthalten. Angeordnet sind die Proteine in einer Ultrastruktur, die für jedes Gewebe und Organ einzigartig ist (B. N. Brown et al., 2014). Sie präsentiert das ideale Mikromilieu, in welchem organspezifische Parenchymzellen ihren Phänotyp und ihre Funktionalität aufrechterhalten können (Soto-Gutierrez et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass ihre 3-dimensionale Ultrastruktur Einfluss auf das Zellverhalten, Migration und Differenzierung hat (B. N. Brown et al., 2014). Somit bildet die EZM eine ideale Matrix zur Re-Besiedelung mit *in vitro* kultivierten Zellen. Es gibt spezifische Unterschiede der EZM, je nachdem aus welchem Organ oder Gewebe sie entnommen wurde. So sollte für jeden Zelltyp die entsprechende EZM verwendet werden (Badylak et al., 2011). Als Beispiel dient das Modell von Sellaro, der nachwies, dass aus Lebergewebe gewonnene EZM eine gute Grundlage für die Re-Besiedelung mit Hepatozyten darstellt (Sellaro et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde dezellularisierte, porcine Speicheldrüse als Matrix für humane Parotiszellen verwendet. Die porcine Matrix hat viele Vorteile, um später nach der Re-Besiedelung in den menschlichen Organismus transplantiert zu werden. Sie ähnelt in Form und Größe den humanen Organen.

Außerdem besteht ein geringes Risiko der Übertragung von Infektionserregern (Arenas-Herrera et al., 2013).

Kollagen und Elastin spielen wichtige Rollen bei der Aufrechterhaltung der vollständigen Struktur von dezellularisierten Matrices. Elastin ist eine wichtige EZM-Komponente und überträgt mechanische Festigkeit und Elastizität, die für die Funktion und Langlebigkeit von Geweben und Organen notwendig ist. Kollagen ist das häufigste, ubiquitär vorkommende Protein in Säugern und verschafft der EZM-Struktur Festigkeit (Hiles et al., 2006). Es gibt 28 verschiedene Kollagentypen. In dezellularisierten Matrices wurden die Kollagentypen 1, 2 und 4 nachgewiesen (Baptista et al., 2011; Petersen et al., 2010; Uygun et al., 2010). Kollagen Typ 1 ist die häufigst vorkommende Form von Kollagen in Körper (Baptista et al., 2011). Für einen erfolgreichen Re-Besiedelungsprozess ist die Zelladhäsion zur dezellularisierten Matrix entscheidend. Oft können Zelladhäsionspeptide in der Matrix mit Teilen der Integrine, die in der Zellmembran verankert sind und von vielen Zelltypen exprimiert werden, binden (Saksela et al., 1988). Da Kollagen Zelladhäsionspeptide enthält, spielt es somit eine wichtige Rolle für den Re-Besiedelungsprozess (Kanematsu et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Brown charakterisierte dezellularisierte, porcine Blasenschleimhaut, Jejunum und Lebergewebe. 90% des Trockengewichts der EZM bestand aus Kollagen (B. Brown et al., 2006). So kann davon ausgegangen werden, dass auch die EZM aus dezellularisiertem, porcinen Speicheldrüsengewebe hauptsächlich Kollagen enthält. In Studien wurde Speicheldrüsengewebe auf verschiedene Kollagentypen untersucht. So wies die Arbeitsgruppe um Hardman in embryonalem Mäusespeicheldrüsengewebe Kollagen I, IV und V nach (Hardman et al., 1992). In der dezellularisierten Glandula submandibularis von Mäusen wurde Kollagen I, II und III nachgewiesen (Deng, Tan, et al., 2004). Auch nach Behandlung der Glandula submandibularis von Ratten mit Triton X wurden im Elektronenmikroskop Kollagenfasern als Netzstruktur erkannt (Deng, Liu, et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden dezellularisierte, und als Vergleich native, porcine Speicheldrüsenstücke auf ihren Gesamt-Kollagen- und Elastingehalt untersucht. Kollagen und Elastin wurden nachgewiesen. Dadurch ist eine Voraussetzung, die dezellularisierte, porcine Speicheldrüse als Gerüst für den Aufbau von 3-dimensionalen *in vitro* Zellsystemen und für Transplantate zu verwenden, erfüllt. Jedoch war der Gesamt-Kollagen- und Elastingehalt in den dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücken niedriger als in den nativen. Die Arbeitsgruppe um Badylak wies darauf hin, dass die Dezellularisierungslösungen die Struktur und Zusammensetzung der EZM schädigen können (Badylak et al., 2011). Es scheint, als

würde Kollagen und Elastin während des Dezellularisierungsprozesses teilweise aus der Matrix herausgelöst werden. Da Kollagen und Elastin eine wichtige Rolle für die Zelladhäsion spielen, könnte dies eine mögliche Ursache für schlechte Re-Besiedelungserfolge des dezellulierten, porcinen Speicheldrüsengewebes sein. Um das Ergebnis zu verbessern, könnte man die Dezellularisierungsdauer verkürzen und die Konzentration an Natriumdesoxycholat verringern. Auch das Einsetzen von weiteren Dezellularisierungsmitteln wie Triton X wäre möglich. Das passende Dezellularisierungsprotokoll ist ausschlaggebend für den Erfolg der Re-Besiedelung des Gewebes (Badylak et al., 2011).

Den bestmöglichen Dezellularisierungserfolg zu erreichen, bei dem die Struktur der Matrix weitestgehend erhalten bleibt, sollte Gegenstand weiterer intensiver Forschungsbemühungen sein.

4.4 Kultivierung und Charakterisierung von humanen Parotiszellen in 2-dimensionaler Monokultur

4.4.1 Kultivierung einer primären, adhärenen Zelllinie von Speicheldrüsenzellen

Zur Basis der regenerativen Medizin gehören transplantierbare Zellen (Kagami et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden 1 mm³ große Parotisstücke eines Patienten gewonnen, um eine primäre Zellkultur für die Besiedelung einer Matrix aus porciner Speicheldrüse zu gewinnen. Dabei spielt die Qualität des gewonnenen Speicheldrüsenstückes eine große Rolle. Zu den entscheidenden Faktoren zählen das Alter, das Geschlecht (Bajpayee, Dhawan et al. 2002) und die frühere Schadstoffexposition, denen die Patienten ausgesetzt waren. Diese kann DNA-Schäden verursacht haben. Da das Auftreten von benignen Tumoren der Speicheldrüsen oft erst im mittleren bis höheren Alter (Doerr et al. 1996) auftritt, waren die Patienten meistens schon über 60 Jahre alt. Auch der Bindegewebsanteil im Speicheldrüsenstücken schien bei älteren Patienten erhöht zu sein. Da das den Patienten entnommene Speicheldrüsenstücken einen unterschiedlichen Anteil an Bindegewebe aufwies, wuchsen am Boden der Wellplatte um die kleinen Gewebestückchen nicht nur Parotiszellen, sondern in unterschiedlichem Maße auch Fibroblasten aus. Die Fibroblasten waren in der Lage, die Kultur schnell zu überwuchern. Dieses Phänomen beschrieb auch die Arbeitsgruppe um Hiraki in seiner Arbeit (Hiraki et al. 2002). Daher sollte das Zurechtschneiden des Parotisstückes so erfolgen, dass das Bindegewebe der Kapsel entfernt wird. Die Kultivierung erfolgte

nach einem etablierten Schema des HNO-Labors der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg (Kapitel 2.3).

4.4.2 Charakterisierung der kultivierten, humanen Parotiszellen

Schon viele Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit dem Thema, Speicheldrüsenzellen zu gewinnen und zu kultivieren, um sie dann auf eine geeignete Matrix aufzubringen. Ein wichtiges Ziel des Tissue Engineerings ist es, die Differenzierung und Funktion der Speicheldrüsenzellen *in vitro* aufrecht zu erhalten (Bucheler et al., 2002). Hepatozyten beispielsweise verlieren in einer 2-dimensionalen Monokultur nach einigen Tagen ihre Funktion und typische Morphologie (Linke et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Szlavik kultivierte humane Speicheldrüsenzellen über mehrere Passagen auf einer Plastikoberfläche mit einer Methode, die der in der vorliegenden Arbeit angewandten sehr ähnlich ist. Die Zellen bildeten eine 2-dimensionale Zellschicht aus und zeigten in der ersten Passage in der Immunfärbung eine unterschiedlich starke bis schwache α -Amylaseproduktion in benachbarten Feldern. Durch den PCR-Nachweis von α -Amylase wurde in den nächsten 4 Passagen eine dramatisch sinkende α -Amylaseproduktion festgestellt. Die Zellen bildeten keine azinusähnlichen Strukturen sondern nur sporadische Kluster aus, die mit der Zeit wieder in ihrer Zahl abnahmen. Nach einem Monat der Kultivierung verloren die Zellen ihren Kontakt zur Unterlage und wurden von Fibroblasten überwuchert. Die Arbeitsgruppe um Szlavik geht davon aus, dass bei der Kultivierung verschiedene Zelltypen wie Epithelzellen, mesenchymale Zellen und Speicheldrüsenvorläuferzellen vorhanden sind. Differenzierte Epithelzellen wie Azinus- und Duktuszellen dedifferenzieren sich wieder, mesenchymale Zellen wie Fibroblasten proliferieren am schnellsten und Speicheldrüsenvorläuferzellen stellen die Quelle der epithelialen Zellen dar (Szlavik et al., 2008). Auch die Arbeitsgruppe um Hiraki beschrieb eine abfallende Vitalität und Proliferation der Speicheldrüsenzellen in Kultur über einen längeren Zeitraum (Hiraki et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Ablösen der Zellen vom Boden der Wellplatte nach einem Monat festgestellt werden. Die Proliferationsrate der Zellen nahm auch nach der 5. Passage nicht ab. Nachgewiesen wurde die Vitalität der Speicheldrüsenzellen durch die FDA/EB-Vitalfärbungen (Kapitel 2.10.1). Es bildeten sich aber keine azinusförmigen Strukturen aus.

Um die Intrazellulärstruktur einzelner, humaner Parotiszellen zu beurteilen, wurden stichprobenartig von einigen Zellen eines Patienten der Passage 2

Transmissionselektronenmikroskopiebilder angefertigt. Die Zellen besaßen einen runden Zellkern, der von kleinen Granula umgeben war. Dies weist darauf hin, dass die Zellen in der Lage sind, α -Amylase unter 2-dimensionalen Kulturbedingungen zu produzieren. Des Weiteren bildeten sie Zellfortsätze aus, mit denen Kontakte zur Matrix und zu anderen Zellen gebildet werden.

Es wurden weitere Untersuchungen durchgeführt: Über 3 Passagen wurden humane Parotiszellen von 10 verschiedenen Patienten kultiviert und auf ihre Eigenschaft untersucht, α -Amylase, Pan-Cytokeratin und Aquaporin 5 zu produzieren. Durch Immunfluoreszfärbungen konnte man erkennen, dass α -Amylase im Zytoplasma je nach Qualität des entnommenen Speicheldrüsengewebes schwach bis stark vorhanden war. Über 3 Passagen hinweg konnte kein Absinken der α -Amylasekonzentration nachgewiesen werden. Auch die PCR-Ergebnisse bestätigten eine konstante α -Amylaseexpression von Speicheldrüsenzellen über 3 Passagen von $n=3$. In der Positivkontrolle wurde α -Amylase stärker exprimiert. Es ist somit in der vorliegenden Arbeit gelungen, die α -Amylase-Produktion der Azinuszellen über 3 Passagen in einer 2-dimensionalen Monokultur aufrecht zu erhalten.

Durch die Anfärbung mit Cytokeratin wurde der epitheliale Charakter der Zellen bestätigt (Bucheler et al., 2002). Die kultivierten Zellen der vorliegenden Arbeit zeigten eine starke Färbung für Pan-Cytokeratin. Im Gegensatz dazu fiel die Färbung der Fibroblasten negativ aus. Auch in der PCR konnte eine starke Genexpression von Cytokeratin 18 über alle Passagen nachgewiesen werden.

Aquaporine sind Proteine, die Wasserkanäle in der Zellmembran bilden und so die Wasserpermeabilität der Zelle steigern. Es sind keine Pumpen oder Austauscher, sondern das Wasser richtet sich nach dem osmotischen Gradienten und kann in beide Richtungen durch den Kanal ohne Energieaufwand geschleust werden. Man findet sie vor allem in Gewebe, welches auf schnellen Wasseraustausch angewiesen ist wie z. B. Drüsengewebe, Niere, Respirationsepithel, Tränendrüse und Erythrozyten. Die Aquaporine bewirken eine 10-100fach höhere Wasserpermeabilität in diesen Geweben (Agre et al., 2002). Es sind 11 Isotypen bekannt (Matsuzaki et al., 2002). Aquaporin 5 ist für den Hauptwasserfluss der Azinuszellen zum Lumen der Speicheldrüse von großer Bedeutung (Joraku et al., 2005). Lokalisiert sind sie in der apikalen und basolateralen Membran von Azinuszellen der Glandula parotidea (Nakamura et al., 2013) und bilden den Hauptteil der Aquaporine (Susa et al., 2013). Das

Wasserkanalprotein Aquaporin 5 wurde nicht oder nur sehr schwach in den Zellen exprimiert, was mittels der PCR analysiert wurde. Die Arbeitsgruppe um Joraku beschrieb, dass primäre, humane Speicheldrüsenzellen in einer 2-dimensionalen Monokultur ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften beibehalten. Sie wurden mit immunhistologischer Färbung für α -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratinen AE1 und 3 positiv angefärbt. Über 7 Subkulturen konnten konstante Level von α -Amylaseaktivität festgestellt werden. Jedoch war Aquaporin 5 nur bei voll differenzierten Zellen exprimiert (Joraku et al., 2005). Dieses Ergebnis stimmt mit unserem Versuch überein, da Aquaporin 5 in der Immunfluoreszenz nicht vorhanden und in der PCR nur sehr schwach exprimiert wurde, was auf wenig voll differenzierte Zellen in der 2-dimensionalen Monokultur spricht.

Eine weitere Studie der Arbeitsgruppe um Joraku beschrieb, dass eine 3-dimensionale Gewebestruktur für humane Speicheldrüsenzellen wichtig ist, um azinäre und duktale Strukturen zu bilden. Auf einer Matrix aus Kollagen und Matrigel behielten die Zellen ihren phänotypischen und funktionellen Charakter. Es wurden durch PCR und immunhistochemische Färbungen Occludin, Claudin 1, ZO-1, Aquaporin 5 und α -Amylase nachgewiesen. Mit dem Elektronenmikroskop konnten Bilder von Desmosomen, Microvilli und Sekretgranula aufgenommen werden (Joraku et al., 2007). Auch Lichtenberg beschrieb den positiven Effekt von dynamischen, 3-dimensionalen Zellkulturbedingungen in einem Bioreaktor auf einer bioabbaubaren Fibrinmatrix mit kontinuierlichem Mediumwechsel durch Perfusion, wodurch die Zellen ihre Differenzierung beibehalten. Eine Kokultur würde zusätzlich für Zelldifferenzierung, -aktivität und -tod eine wichtige Rolle spielen (Lichtenberg et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um Szlavik brachte primäre, humane Speicheldrüsenzellen der Glandula submandibularis auf einem Basalmembranextrakt anstatt auf einer Plastikoberfläche auf. Sie konnte zeigen, dass die Zellen nach 24 Stunden anfangen, Azinus- und Tubulusstrukturen zu bilden und α -Amylase produzieren. Dieses Modell beweist, dass Speicheldrüsenzellen Differenzierungs- und Regenerationsfähigkeitspotential besitzen (Szlavik et al., 2008). Basalmembran-komponenten spielen dabei eine entscheidende Rolle bei der morphologischen und funktionellen Differenzierung der Speicheldrüsenzellen. Da bei der Kultivierung in der vorliegenden Arbeit die humanen Parotiszellen keine azinusförmigen Strukturen ausbildeten, könnte das Zugeben von Basalmembran-komponenten oder Kultivierung in einer Kokultur eine wichtige Rolle spielen.

Vermutlich ist die 2-dimensionale Kultivierung von humanen Speicheldrüsenzellen einer vollen Differenzierung der Zellen nicht dienlich. Nur eine 3-dimensionale Matrix, die eine Interaktion der Moleküle der EZM und der anhaftenden Zellen ermöglicht, verhilft zur Ausbildung von azinären und duktalem Strukturen und damit zur Bildung von Aquaporin 5. Um diese Theorie zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen folgen, z. B. könnte die Bildung von Aquaporin 5 durch adhärenente Zellen auf der Matrix mittels Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht werden.

4.4.3 Weitere Möglichkeiten zur Zellgewinnung

Zur idealen Re-Besiedelung von Organen sollten die verwendeten Zellen von Patienten durch minimalinvasive Eingriffe erhalten werden, sich leicht vermehren lassen, voll charakterisiert sein, keine Immunantwort bei Transplantation hervorrufen und ihre volle Funktionsfähigkeit auf der neuen Matrix erlangen. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Sugito wurden Speicheldrüsenzellen einer Ratte gewonnen und kultiviert. Bei der Gewinnung wurde gleichzeitig der Ausführungsgang der Unterkieferspeicheldrüse abgebunden und so eine atrophische Drüse erzeugt. Nach einer Woche wurde die Ligatur entfernt. Die kultivierten Zellen wurden mit der Fluoreszenzfärbung PKH 26 markiert und in die Drüse injiziert. Nach 2-4 Wochen verteilten sich die Zellen um die Azini und duktalem Regionen. Somit gibt es Hinweise darauf, dass eine Zell-Retransplantation von Speicheldrüsenzellen möglich ist (Sugito et al., 2004) und eine primäre, adhärenente Zelllinie von Speicheldrüsenzellen einige Anforderungen des Tissue Engineerings von Speicheldrüsenzellen erfüllt. Doch kommen primäre, adhärenente Zelllinien zur Besiedelung von kompletten, dezellularisierten Organen immer weniger zum Einsatz. Es scheitert am Unvermögen der Zellen sich in einer so großen Anzahl zu vermehren, um ein komplettes Organ zu re-besiedeln (Moser et al., 2014). Eine vielversprechende Alternative ist die Gewinnung von Progenitorzellen. Jedoch sind die Möglichkeiten in der Forschung, diese zu identifizieren und zu charakterisieren, begrenzt (van Berlo et al., 2014). Auch die Vermehrung *in vitro* und die Aufrechterhaltung ihrer Vorläuferidentität bleibt eine Herausforderung (Sneddon et al., 2012). Eine weitere Option ist die Anwendung von induzierten, pluripotenten Stammzellen (induced pluripotent stem cells, iPSCs), die aus Körperzellen des Patienten gewonnen werden können. Bei der Reprogrammierung von Körperzellen besteht nicht der ethische Konflikt wie er bei embryonalen Stammzellen besteht. Eine Vermehrung und Differenzierung der iPSCs in andere Zelltypen ist möglich (Takahashi et al., 2006). Sie besitzen im Vergleich zu differenzierten Zellen eine höhere Proliferationsfähigkeit und können besser in die 3-dimensionale Struktur der Matrix

einwandern (Boheler et al., 2011). In einer Studie wurden komplette, dezellularisierte Mäuseherzen mit aus humanen iPSCs erhaltenen, kardialen Progenitorzellen erfolgreich re-besiedelt. Eine Differenzierung zu Kardiomyozyten und eine Migration aus den Gefäßen in die Ventrikelwand konnte nachgewiesen werden (Lu et al., 2013). Komplette, humane, dezellularisierte Herzen wurden aus iPSCs stammenden Kardiomyozyten re-besiedelt. Nach 120 Tagen Kultivierung konnte funktionelles, myokardiales Gewebe nachgewiesen werden (Guyette et al., 2016). Doch das Risiko der Tumorbildung verhindert noch den Einsatz von iPSCs in klinische Studien (Lian et al., 2012).

Für die Re-Besiedelung von kleinen, dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsengewebestücken scheinen *in vitro* kultivierte, primäre Zellen ausreichend zu sein. Sollten in einem nächsten Schritt komplette, dezellularisierte, porcine Speicheldrüsen re-besiedelt werden, sollten auch andere Alternativen zur Zellgewinnung in Betracht gezogen werden.

4.5 Beurteilung der Besiedelungsversuche

4.5.1 Besiedelungsversuche von dezellularisierten Speicheldrüsenstücken mit humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen

In den ersten Besiedelungsversuchen wurden die Matrices mit ca. 250.000-1.000.000 humanen Parotiszellen besiedelt, für 15 min im Inkubator inkubiert und anschließend auf jedes Konstrukt BEGM pipettiert. Nach zwei Tagen hatten sich viele Zellen auf dem Boden der Wellplatte abgesetzt und bildeten keine Adhärenz zur Matrix aus. Auf den ausgewerteten Kryo- und Paraffinschnitten zeigten sich auf der Oberfläche der Konstrukte einzelne, deformierte Zellkerne. Bei den Konstrukten, die mit Fibrinkleber vorbehandelt waren, zeigten sich nur einige Zellen im Fibrinkleber an der Oberfläche des Konstrukts. Im Rasterelektronenmikroskop konnte man auf der Oberfläche der Konstrukte keine Zellen erkennen. Die Oberflächenstruktur der Matrix an der Schnittfläche bestand aus einer wabenartigen Struktur aus Bindegewebssträngen, die Hohlräume bildeten. Da die wabenartige Struktur mit ihren Hohlräumen eine ideale Einlagerung von Zellen ermöglichen sollte, wurde beim Zurechtschneiden der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüse so viel Bindegewebskapsel wie möglich entfernt, um viele Schnittflächen zu erhalten. So sollte den Zellen die Adhärenz bei den nächsten Besiedelungsversuchen an die Matrixoberfläche erleichtert werden.

Bei den Re-Besiedelungsversuchen der Arbeitsgruppe um Leyh wurden Myofibroblasten auf porcine Pulmonalklappen gegeben und 4 h bei 37°C im Inkubator inkubiert (Leyh et al., 2003). Sie wurden für 12 h auf eine Rollapparatur gelegt, um eine komplette Besiedelung der Matrix zu sichern. Nach jedem Besiedelungsschritt wurden sie mit DMEM für 24 h gespült. Die Besiedelung wurde insgesamt 3x durchgeführt. Dann erfolgte die Besiedelung mit Endothelzellen mit dem gleichen Protokoll. Es konnte eine vollständige Re-Besiedelung mit einer einschichtigen Endothelschicht sowie eine quantitativ normale Besiedelung der EZM mit Myofibroblasten festgestellt werden. Um die Re-Besiedelung auf unserer Matrix zu verbessern, wurde die Inkubationszeit von 15 min auf 2 h verlängert. Damit hatten die Zellen mehr Zeit, eine Verbindung zur Matrix auszubilden, bevor sie durch Zugeben des Mediums abgeschwemmt werden konnten. Nach einer Kultivierungsdauer von 1 Woche konnte man auf den Konstrukten durch eine Zellkernfärbung mit DAPI sehr viel mehr Zellen auf der Oberfläche erkennen.

Die Zellen, die sich in den ersten Besiedelungsversuchen am Boden des Wells nach 2-4 Tagen der Besiedelung befanden, fluoreszierten hauptsächlich in der FDA/EB-Vitalfärbung rot und waren nicht mehr vital. Es entstand die Frage, ob die dezellularisierte, porcine Speicheldrüse bioinkompatibel für humane Parotiszellen ist und spezifische Oberflächenproteine der Matrix eine Abstoßungsreaktion der Zellen bewirkten. Aber auch die Besiedelung mit porcinen Speicheldrüsenzellen ergab ein unbefriedigendes Ergebnis. Bessere Ergebnisse wurden durch die mehrmalige Waschung der Matrices mit PBS vor der Besiedelung erzielt. Auf den Rasterelektronenmikroskopiebildern waren bei den nächsten Besiedelungsversuchen über die Oberfläche viele Zellen mit kugelförmiger Form ohne ausgebildete Zellfortsätze zu finden.

Da der Gallensäuretest der PBS-Lösung, in der die dezellularisierten, porcinen Speicheldrüsenstücke lagen, hohe Werte von restlicher Desoxycholsäure nachwies, wurden die Matrices beim nächsten Besiedelungsversuch über 3 Wochen mehrmals mit PBS gewaschen. So sollten Rückstände von Natriumdesoxycholatlösung herausgewaschen werden. Nach Anpassung des Besiedelungsprotokolls mit längerer Inkubationszeit der Zellen und vorherigen Waschungen der Matrices war zum ersten Mal auf den Rasterelektronenmikroskopiebildern die gesamte Oberfläche mit Zellen besiedelt. Die Zellen wiesen eine flache Form auf und bildeten Zellfortsätze zu Nachbarzellen aus. Die Untersuchungen der Konstrukte mit der FDA/EB-Vitalfärbung

bestätigten die Vitalität der Zellen auf den Matrices bis zu 21 Tagen Kultivierung nach der Besiedelung. Um eine artifizielle Speicheldrüse herzustellen, ist es notwendig, dass die Speicheldrüsenzellen eine polarisierte Epithelzellschicht bilden, um einen osmotischen Gradienten zu erzeugen. NaCl wird ins Lumen der Azini abgegeben. Außerdem folgt H₂O durch Wasserkanäle wie Aquaporin 5 oder transzellulär ins Lumen. Auf ihrem Weg in den Speicheldrüsenausführungsgang wird NaCl wieder resorbiert und Kaliumionen ins Lumen abgegeben. So entsteht hypotoner Speichel (Baker, 2010). Der intrazelluläre Haftkomplex besteht aus Tight Junctions, Desmosomen, Ansammlungen von Zell-Zell-Kanälen (Gap junctions) und fokale Adhäsionen (focal adhesions). Dieser ist für die Polarisierung wichtig. Die Arbeitsgruppe um Joraku wies auf Elektronenmikroskopiebildern von kultivierten Speicheldrüsenzellen auf einer Matrix aus Matrigel und Kollagen Desmosomen nach. Außerdem wurden Tight Junctions wie ZO 1, Occludin und Claudin 1 immunhistochemisch nachgewiesen (Joraku et al., 2007). Zur Untersuchung von Tight Junctions und Desmosomen im vorliegenden Modell sind weitere immunhistochemischen Färbungen notwendig.

Beim letzten Besiedelungsversuch mit 500.000 oder 1.000.000 Zellen war kein Unterschied bezüglich der Anzahl von adhärierenden Zellen auf der Oberfläche der Matrix erkennbar. Es konnte eine gute Adhärenz der Zellen auf der Oberfläche der Matrix gezeigt werden, was für eine gute Biokompatibilität spricht. Man fand allerdings keine Zellen im Inneren der Matrix. Die Porengröße an der Schnittfläche ist so groß, dass sich humane Speicheldrüsenzellen gut ansiedeln können, wie im REM gezeigt wurde. Die Poren sind durch das Bindegewebsgerüst voneinander getrennt. Es waren nur sehr wenige Zellen im Inneren der Matrix auf den HE-Färbungen zu erkennen. Somit ist anzunehmen, dass die Zellen besser über das Gefäßsystem in das Innere der Matrix gelangen.

Die Arbeitsgruppe um Gao entnahm die Glandula submandibularis von 8 Wochen alten Ratten. Diese wurden am Stück nach dem veröffentlichten Protokoll von der Arbeitsgruppe um Gilbert (Gilbert et al., 2006) dezellularisiert. Die Re-Besiedelung fand über den Ausführungsgang der Glandula submandibularis statt. Es wurden dafür ca. $22,62 \times 10^6$ Zellen von 4 Wochen alten Ratten der Glandula submandibularis isoliert. Die Inkubation fand über 12h bei 37°C und 5% CO₂ in brustdrüsenepithelialem Wachstumsmedium (mammary epithelial growth medium, MEGM) statt. Die Zellen konnten in der Zeit adhärieren. Dann wurde die re-besiedelte Glandula

submandibularis in MEGM auf einem rotatorischem Zell-Kultur-System eingelegt und 14 Tage bei zweitägigem Mediumwechsel inkubiert. Die Dezellularisierung war erfolgreich. Die zur Re-Besiedelung verwendeten Zellen adhärten und bildeten speicheldrüsenähnliches Gewebe (Gao et al., 2014). Die erfolgreiche Re-Besiedelung einer dezellulierten, porcinen Speicheldrüse kann voraussichtlich auch über ihren freipräparierten Ausführungsgang erfolgen.

4.5.2 Funktionalisierung der Oberfläche der dezellulierten, porcinen Speicheldrüse vor Besiedelung mit humanen Speicheldrüsenzellen

Um das Anhaften von humanen Speicheldrüsenzellen auf einer Matrix aus Poly-L-Milchsäure (Poly-L-lactic acid, PLA) und Polyglykolsäure (Polyglycolic acid) zu verbessern, führte die Arbeitsgruppe um Baum Versuche mit 10%igem, fetalem Kälberserum durch, mit der die Matrix behandelt wurde. Dadurch hafteten mehr Zellen auf allen Matrices und fingen an, zu proliferieren. Andere Versuche wurden mit Fibronectin, Laminin, Kollagen I, IV und Gelatine durchgeführt. Fibronectin verbesserte die Anhaftung, förderte das Wachstum (Baum et al., 2006) und spielt eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, Wachstum, Migration und Differenzierung der Zellen (Miyamoto et al., 1998). Laminin ist ein Protein in der Basalmembran der meisten Zellen und Organe. Es enthält Polypeptidsequenzen, die für die Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielen (Schwarzbauer, 1999). Wachstumsfaktoren und bioaktive Moleküle beeinflussen auch das Verhalten der Zellen bei der Re-Besiedelung der Matrix. Glykosaminoglykane (GAGs) schützen die Wachstumsfaktoren vor proteolytischem Abbau. Hyaluronsäure ist ein Teil der GAGs und spielt eine wichtige Rolle für viele Aspekte des zellulären Verhaltens wie z. B. die Polarisierung der Zellen. Während des Dezellularisierungsprozesses gehen 50-90% der GAGs verloren (Petersen et al., 2010). Das kann eine Inaktivierung der Wachstumsfaktoren verursachen und beeinflusst somit die effiziente Re-Zellularisierung. Die Arbeitsgruppe um Aframian verwendete Poly-L-Milchsäure und Polyglykolsäure-Matrices, die sie mit den Fibronectin, Laminin, Kollagen I, IV und Gelatine beschichtete. Auch diese Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass die Zellen ohne die Beschichtung nicht gut auf den Matrices anhafteten (Aframian et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um Bucheler verwendete Cytodex 3 aus denaturiertem Kollagen I und Cytopore 1 aus Zellulose als Matrix für humane Speicheldrüsenzellen. 60-70% der Zellen hafteten an und bildeten Kluster aus. Die restlichen Zellen befanden sich nach den ersten Tagen auf der Kulturplatte. Die Zellen überlebten bis zu 3 Wochen auf den Matrices (Bucheler et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit Fibrinkleber, Laminin/Fibronectin, Kollagen I, Hydrogel und Fibroblasten durchgeführt. Fibrinkleber ist biokompatibel, bioabbaubar und ähnelt verschiedenen, biologischen Oberflächen (Bensaid et al., 2003). Man kann es aus dem Blut von Patienten gewinnen, um so die Immunreaktion zu begrenzen (Ye et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um Eyrich konnte nachweisen, dass Chondrozyten, suspendiert mit Fibrinkleber, auf Hydrogel-Matrices besser wachsen und extrazelluläre Matrixkomponenten wie Glykosaminoglykane und Kollagen II produzieren (Eyrich et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Ahmed beschrieb gute Erfolge bei der Nutzung von Fibrin als biologische Matrix im Tissue Engineering von Stammzellen und primären Zellen um z. B. Fett-, Knorpel-, Knochen-, Leber-, Augen-, Hautgewebe zu regenerieren (Ahmed et al., 2008). Auch bei der Gefäßregeneration durch Tissue Engineering wird Fibrinkleber als Matrix erfolgreich verwendet (Shaikh et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Ye besiedelte Fibrinkleber mit humanen Myofibroblasten, die aus der Aorta gewonnen wurden. Sie konnte ein homogenes Zellwachstum und eine Kollagenproduktion im Fibrinkleber feststellen (Ye et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte man nach der Beschichtung mit Fibrinkleber nach einer Woche Kultivierung eine zähe Schicht im Rasterelektronenmikroskop auf der Oberfläche der Matrix zu erkennen, unter welcher kugelige Zellen auszumachen waren. Die Zellstruktur konnte daher nur teilweise charakterisiert werden. Auf den Matrices mit Fibrinkleber blieben die Zellen vor allem im Fibrinkleber hängen und bildeten keine Verbindung zur Oberfläche der Matrix aus. Ein ähnliches Ergebnis zeigten die Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen der Konstrukte, die mit Hydrogel behandelt wurden. Durch die FDA/EB-Vitalfärbungen konnte man Zellen erkennen, die azinusähnliche Strukturen formten. Dieses Phänomen wurde schon von der Arbeitsgruppe um Pradhan beschrieben, die auf einem Hyaluronsäure-Hydrogel primäre, humane Speicheldrüsenzellen kultivierten. Hier war eine Differenzierung von Azinuszellen in lobuläre Strukturen zu erkennen. Diese wurden auf Tight Junctions untersucht und exprimierten ZO-1 (Pradhan et al., 2010). Bei weiteren Besiedelungsversuchen der Arbeitsgruppe um Pradhan organisierten sich die primären, humanen Speicheldrüsenzellen auf der Matrix aus Hyaluronsäure-Hydrogel zu 100 µm großen Spheroïden und konnten bis 100 Tage in Kultur gehalten werden. Sie vereinigten sich zu Strukturen bis 500 µm Größe. Als weiteren Schritt wurden sie in eine athymische Ratte implantiert. Die Zellen blieben über 3 Wochen vital und behielten ihre spheroidale Struktur bei (Pradhan-Bhatt et al., 2013).

Die mit Laminin/Fibronectin und Kollagen I beschichteten Oberflächen unterschieden sich bezüglich des Zellwachstums nicht voneinander. Es lagerten sich auf beiden Matrices viele kugelige Zellen auf der Oberfläche an. Die zuvor mit Fibroblasten besiedelten Matrices bildeten ein Geflecht, was sich über die ganze Oberfläche erstreckte und in der sich kugelförmig die humanen Parotiszellen einlagerten. Bezüglich der Zellzahl auf den Matrices konnte keine erkennbare Veränderung festgestellt werden. Insgesamt konnte durch die Beschichtungsversuche keine Verbesserung der Zelladhäsion oder Migration festgestellt werden.

Für den nächsten Schritt sind immunhistochemische Untersuchungen notwendig, um die adhärierenden Zellen auf der Matrix zu charakterisieren und um herauszufinden, ob diese eine Polarisierung aufweisen.

4.5.3 Suche nach geeigneten Matrices für die Besiedelung mit humanen Speicheldrüsenzellen

2007 beschrieb die Arbeitsgruppe um Joraku das Aufbringen von kultivierten, humanen Speicheldrüsenzellen auf einer basalmembranartigen Matrix (Matrigel), das Kollagen enthielt. Elektronenmikroskopiebilder zeigten Mikrovilli, Desmosomen und sekretorische Granula in den Speicheldrüsenzellen. Sie formten funktionelle Speicheldrüseneinheiten aus Azinus- und Gangstrukturen und exprimierten α -Amylase und Aquaporin 5 (Joraku et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Maria brachte kultivierte, humane Zellen der Glandula parotidea und submandibularis auf eine Kulturschale auf, die man zuvor mit Matrigel beschichtete (Maria et al., 2011). Matrigel besteht aus einer Mischung extrazellulären Matrixproteine, die von der Sarkom-Zelllinie Englebreth-Holm-Swarm (EHS) aus Mäusen gewonnen wird (Kleinman et al., 2005). Azinuszellen bildeten darauf innerhalb von 24h azinusähnliche, 3-dimensionale Einheiten aus. Als Vergleich wurden Zellen auf der Kulturschale ohne Matrigel kultiviert. Die Zellen bildeten nur eine Monoschicht von Gangzellen aus. Bei 99% der auf Matrigel aufgebrachten Zellen konnte α -Amylase und Aquaporin 5 durch RT-PCR und die Organisation und Differenzierung von humanen Speicheldrüsenzellen mit azinärem Phänotyp nachgewiesen werden (Maria et al., 2011). Außerdem wurden Zellkontakt (Tight Junctions)-Proteine wie Occludin und Claudin 1-4 exprimiert. Da Matrigel aber aus der Sarkom-Zelllinie von Mäusen stammt, ist es patienteninkompatibel und kann nicht für Transplantationen eingesetzt werden.

Ein Forschungsprojekt beschäftigte sich mit dem Versuch, eine Matrix aus Polyglykolsäure Polymer mit kultivierten, primären Speicheldrüsenzellen zu besiedeln. Die Gewinnung und Kultivierung der Speicheldrüsenzellen erfolgte mit der gleichen Methode, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde. Nach Aufbringen von 50×10^6 Zellen auf 1 cm^3 der Matrix aus Polyglykolsäure Polymer, wurde diese in athymische Mäuse implantiert. Nach 2-8 Wochen wurden sie explantiert und histologisch untersucht. Die Zellen formten azinusähnliche Strukturen. Auch α -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin wurden exprimiert (Joraku et al., 2005). In weiteren Forschungsprojekten könnte man die Matrix aus Polyglykolsäure Polymer durch dezellularisierte, porcine Speicheldrüsenstücke, re-besiedelt mit primären, humanen Speicheldrüsenzellen, ersetzen und in athymische Mäuse implantieren. Nach 2-8 Wochen könnten sie explantiert, histologisch auf das Einwachsen von Blutgefäßen und das Vorhandensein von α -Amylase, Aquaporin 5 und Cytokeratin untersucht werden.

In weiteren Quellen aus Dissertationen der eigenen Arbeitsgruppe wird zum einen das Aufbringen der kultivierten, primären Speicheldrüsenzellen auf eine Matrix aus Polyurethan untersucht, zum anderen wird dargestellt, ob primäre, humane Speicheldrüsenzellen auf einer Matrix aus dezellularisiertem Jejunum anhaften und proliferieren. Das Anhaften der Zellen auf Polyurethan erwies sich bis jetzt als schwierig. Hingegen erzielte das Aufbringen der Zellen auf die Matrix aus dezellularisiertem Jejunum schon gute Ergebnisse. Vermutlich wird die dezellularisierte, porcine Speicheldrüse für die Besiedelung mit humanen Parotiszellen weiter in den Fokus des Interesses rücken, da sie die ideale EZM liefert.

4.6 Ausblick

Ziel nächster Forschungsprojekte wird die Dezellularisierung einer kompletten, porcinen Speicheldrüse darstellen. Die Präparation einer porcinen Glandula mandibularis mit anhängendem Gefäßstiel aus Arteria und Vena facialis ist bereits gelungen. Durch diese Möglichkeit, die Speicheldrüse an einen rückführenden Perfusionskreislauf anzuschließen, kann die Dezellularisierungslösung über das Gefäßsystem ein- und ausgespült werden. So würde man das Risiko von restlicher Natriumdesoxycholatlösung im dezellularisierten Organ verringern. Dieses Verfahren wurde von der Arbeitsgruppe um Ott anhand humaner Nieren, die für eine Transplantation nicht mehr geeignet waren, mit gutem Dezellularisierungserfolg

beschrieben (Ott, 2015). Ein Dezellularisierungsprotokoll speziell für porcine Speicheldrüsen müsste ausgearbeitet und standardisiert werden. Nach der Dezellularisierung des vollständigen Organs könnten die humanen Parotiszellen über das Gefäßsystem in der Speicheldrüse verteilt werden. Durch dieses Verfahren würden keine Zellen von der Oberfläche mehr abgeschwemmt und die Zellen könnten im Inneren des Organs adhären und wachsen. Die Re-Besiedelung mit Endothelzellen oder organspezifischen Parenchymzellen über das Gefäßsystem verschiedener dezellularisierter Organe und Gewebe wird am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg bereits praktiziert (Schanz et al., 2010). Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist das Einsetzen von induzierten, pluripotenten Stammzellen im Tissue Engineering, um so eine erfolgreiche Re-Besiedelung des kompletten Organes mit Erhaltung der spezifischen Funktionen zu regenerieren. Es ist noch viel Forschungsarbeit notwendig, um eine artifizielle Speicheldrüse zu generieren.

5 Zusammenfassung

Bei Patienten, die wegen eines Tumors von Kopf- und Hals bestrahlt werden, kommt es zu einem irreversiblen Funktionsverlust des Speicheldrüsengewebes. Die daraus resultierende Mundtrockenheit beeinträchtigt die Lebensqualität der Patienten in hohem Maße und führt zu Dysphagie, bakterieller Mundhöhleninfektion, oraler Pilzbesiedelung, Karies und reduziertem Geschmackempfinden. Bisherige Forschungsbemühungen brachten kein Konzept hervor, welches die postradiogene Mundtrockenheit suffizient reduzieren kann. Eine mögliche Alternative zu den derzeit verfügbaren Behandlungsmethoden bietet das Tissue Engineering. Das Ziel ist die Generierung einer artifiziellen Speicheldrüse, die nach erfolgter Bestrahlung in den menschlichen Organismus implantiert werden kann, um so für die notwendige Speichelproduktion zu sorgen.

Es wurden humane Parotiszellen verschiedener Patienten in einer 2-dimensionalen Monokultur herangezüchtet und über mehrere Passagen kultiviert, um sie anschließend zu charakterisieren. Zur Entwicklung einer extrazellulären Matrix für die Besiedelung mit humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen wurden porcine Speicheldrüsen mit einem modifizierten Dezellularisierungsprotokoll für porcines Jejunum, entwickelt von der Arbeitsgruppe um Mertsching, behandelt (Mertsching et al., 2009). Nach der Dezellularisierung wurden sie in kleine Stücke geschnitten. Um verschiedene Einflussfaktoren für die Adhärenz der Zellen auf der Matrix zu verbessern, erfolgten unterschiedlich lange Waschungen der Matrices mit PBS und Vorbehandlungen mit verschiedenen Substanzen vor der Besiedelung. Die Besiedelung mit humanen und porcinen Speicheldrüsenzellen erfolgte mit unterschiedlichen Zellzahlen und Inkubationszeiten.

Die Frage, ob die humanen Parotiszellen über mehrere Passagen in einer 2-dimensionalen Monokultur *in vitro* ihre charakteristischen Eigenschaften beibehalten, kann wie folgt beantwortet werden: Die Vitalität und das Wachstumsverhalten der humanen Parotiszellen wurden durch die Kultivierungsmaßnahmen in der 2-dimensionalen Monokultur über die Passagen nicht verringert. Auch ihre charakteristische Eigenschaft, α -Amylase zu bilden, blieb während der Passagen erhalten und wurde durch histologische Färbungen und auf RNA-Ebene nachgewiesen. Aquaporin 5-Wasserkanäle wurden jedoch nicht ausgebildet. Zu der Frage, wie die humanen Parotiszellen die dezellularisierte, porcine Speicheldrüse als

Matrix annehmen, wurden abhängig vom Besiedlungsprotokoll verschiedene Ergebnisse erzielt. Bei den ersten Besiedlungsversuchen wurden auf den Raster-elektronenmikroskopieaufnahmen und histologischen Schnitten der Konstrukte keine Zellen auf der Oberfläche gefunden. Auch die Zellen auf dem Wellboden, die nicht an der Matrix adhärten, waren größtenteils avital, was durch FDA/EB-Vitalfärbungen bestätigt wurde. Durch den Gallensäuretest wurde bewiesen, dass sich Reste von Desoxycholsäure in der Matrix befanden. Durch mehrmaliges Waschen der Matrix über 3 Wochen in PBS und längere Inkubationszeiten der Zellen auf der Matrix konnten bei den nächsten Besiedlungsversuchen die humanen Parotiszellen an die Oberfläche der Matrix adhären und einen Zellrasen bilden. Die Beschichtungsversuche der Oberfläche der Matrix trugen zu keiner sichtbaren Verbesserung der Adhärenz der humanen Parotiszellen auf der Matrix bei. Um die Frage der Vitalität der anhaftenden, humanen Parotiszellen auf den Konstrukten zu beantworten, wurden FDA/EB-Vitalfärbungen ausgeführt. Die Mehrheit der Zellen auf den Konstrukten der letzten Besiedlungsversuche fluoreszierte grün, was auf ihre Vitalität schließen lässt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Biokompatibilität der dezellularisierten, porcinen Speicheldrüse als Matrix für humane Parotiszellen gegeben ist. Weitere Versuche sind notwendig, um das Dezellularisierungsprotokoll besser anzupassen. Außerdem sollte durch immunhistologische Färbungen nachgewiesen werden, ob die humanen Parotiszellen auf der Matrix ihre charakteristischen Eigenschaften beibehalten. Ein Ziel in der Zukunft wird die Dezellularisierung und Re-Besiedelung einer kompletten, porcinen Speicheldrüse für die Transplantation in den Menschen sein.

6 Summery

Patients who receive radiotherapy treatment in connection with a tumour in their head or in their neck will ultimately experience a loss of function of the salivary gland tissue. The dryness of the mouth resulting from this loss has an extreme effect on the patient's quality of life, as it leads to dysphagia, bacterial infection of the mouth cavity, tooth decay and a reduction of the sense of taste. Up to now research trials have not been able to come up with a concept that can adequately reduce this dryness of the mouth after radiotherapy treatment. One possible alternative to the currently available methods of treatment would be the application of tissue engineering. The aim here is to create an artificial salivary gland which can be implanted into the human organism after successful radiotherapy treatment, thus enabling the production of the necessary amount of saliva.

Human parotid cells derived from different patients were cultivated in a 2-dimensional monoculture for several passages. This was followed by their characterisation. In order to develop an extracellular matrix, which is able to make a colonization with human and porcine salivary gland cells possible, porcine salivary gland cells were treated with a modified decellularization protocol for porcine jejunum, based on the method developed by Mertsching's working group (Mertsching et al., 2009). After the decellularization process, these cells were cut into small pieces. In order to improve the various factors influencing the adherence of the cells on the matrix, the matrices were washed with PBS for different lengths of time and were given pretreatment with various substances before the colonization process. The colonization with human and porcine salivary cells then took place with a varying number of cells and various lengths of incubation periods each time.

The answer to the question as to whether the human parotid cells keep their characteristic features for several passages in a 2-dimensional *in vitro* monoculture would be the following: There was no reduction of the vitality and the growth behaviour of the human parotid cells in connection with the cultivation procedure in the 2-dimensional monoculture during the passages. These cells also retained their characteristic property of creating α -Amylase during the passages. This was proved by a histological staining process and on the basis of RNA. Aquaporine 5 water channels, however, did not develop. Referring to the question regarding how human parotid cells accept the decellularized porcine salivary gland as a matrix, the answer is

that various results, each dependent on the colonization protocol, were achieved. When looking at the images under the scanning electron microscope and at the histological sections of the constructs, no cells could be identified on the surface. The cells on the surface of the cultivation plate that were not adherent to the matrix were also mainly avital. This was confirmed by the FDA/EB vital stains. A bile acid test was able to prove that a residue of sodium deoxycholate solution could be found in the matrix. Having repeatedly washed the matrix in PBS over a period of three weeks and with longer incubation periods of the cells on the matrix in advance, the human parotid cells were able to adhere to the surface of the matrix and create a cell layer during the next colonization experiments. The attempts to coat the surface of the matrix did not, however, lead to an improvement of the adhesiveness of the human parotid cells to the matrix. In order to test the vitality of the human parotid cells adhering on the constructs, FDA/EB vital staining procedures were performed. It could be observed that the majority of the cells were florescent green in colour; a fact which suggests their vitality.

All things considered, it can be said that there is proof of the biocompatibility of the decellularized porcine salivary gland as a matrix for human parotid cells. Further experiments are necessary in order to make the decellularization protocol more suitable for the procedure. In addition it remains to be proved whether the human parotid cells do actually retain their characteristic properties with the help of an immune histological staining process. One important aim for the future will be the decellularization and the creation of a complete porcine salivary gland for human transplantation purposes.

7 Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Geräte

Tabelle 18 **Geräte**

Gerät	Hersteller
Accu-jet®pro, Pipettierhilfe	Accu-jet®, Brand GmbH, Wertheim (D)
Autoklav, Dampfsterilisation	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg (D)
Autoklav 1) Tecnoclav 2) Tischaufoklav 3) Varioklav	Biomedis, Giessen (D) Systec, Wetzlar (D) H+P, Hackermos (D)
CO ₂ Incubator BBD 6220	Heraeus, Hanau (D)
CO ₂ Incubator NU5500E	NuAire Inc., Plymouth, MA (USA)
Critical Point Dryer CPD 030	BAL-TEC AG, Balzers (LIE)
Einbettautomat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Exsikkator	Novus NS-Tubus, Duran Group GmbH Mainz (D)
Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop JSM 7500F	Jeol GmbH, Freising (D)
Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 4000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Gefrierschränke 1) -80°C 2) -20°C	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA (USA) Liebherr, Biberach a.d. Riß (D)
Gelelektrophoresekammer	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
HERAsafe, sterile Werkbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold (D)
Kritisch-Punkt-Trockner (Critical Point Dryer CPD 030)	BAL-TEC AG, Balzers (LIE)
Kryotom, Leica CM1510S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)

Gerät	Hersteller
Kühlplatte	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Kühlraum 4°C	Genheimer, Höchberg (D)
Kühlschrank FKS 5000	Liebherr-Hausgeräte, Biberach an der Riß (D)
Lichtmikroskop 473028	Zeiss, Oberkochen (D)
Mikrotom RM 2255	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Mikrowelle NN-E205W	Panasonic, Hamburg (D)
Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Paraffin-Einbettautomat Mikrom STP120	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
Paraffinspender	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Paraffinstreckbad GFL 1052	Medax, Kiel (D)
PCR Thermocycler, Sensoquest	Biorad Laboratories GmbH, München (D)
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach (D)
Rotator SB3 Stuart®	Fisher Scientific GmbH, Schwerte (D)
Schüttler IKA-Vibrax-VXR elektronik	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Spannungsgenerator EV202, EV243	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
Sputter-Beschichtungsvorrichtung (Sputter Coater SCD 005)	BAL-TEC AG, Balzers (LIE)
Tecan Mikroplattenleser Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim (D)
Thermostat	Eppendorf AG, Hamburg (D)
TissueLyser	Quiagen GmbH, Hilden (D)
Transmissionselektronenmikroskop JEM 2100	Jeol GmbH, Freising (D)
Trockenschrank	Memmert, Schwabach (D)
UV-Kammer: Transilluminator	Vilber Lourmat, Eberhardzell (D)
Vortex Genie 2	Bender u. Hobein AG, Zürich (CH)
Vortex Genie 2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Waage (Analysenwaage+ Präzipitationswaage)	Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern (D)
Wasserbad Julabo U37A	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)

Gerät	Hersteller
Wippschüttler	neoLab, Heidelberg (D)
Zellzählgerät Countress	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)

7.1.2 Verbrauchs- und Labormaterialien

Tabelle 19 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Chirurgisch sterile Einmal-Skalpelle	FEATHER Safety Razor CO., LTD., Osaka, Kinki (J)
Dako Pen	Dako, Hamburg (D)
Deckgläser (24x50 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen (D)
Deckgläser (24x60 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Einbettfilterpapier	Labonord, Mönchengladbach (D)
Einbettkassetten	Klinipath, Duiven (Niederlande)
Einmalpipetten (5/10/25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Filterpapier	Hartenstein, Würzburg (D)
Handschuhe 1) Latex 2) Nitril	1) Cardinal Health, Kleve (D) 1) Kimberly-Clark, Koblenz (D)
Kryoeinbettformen (cryomolds®, Tissue-Tek®, 10 mm ³)	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude (NL)
Mikrotiterplatte 96-Well schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Mikrotom Einmalklingen, Typ A35	Pfm medical, Köln (D)
Objektträger Polysine™ (25x75x1 mm)	Langenbrinck, Emmendingen (D)
PAP-Pen	Science Services GmbH, München (D)
Pasteurpipetten, 230 mm	Brand GmbH, Wertheim (D)
Parafilm®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Petrischalen (94x16 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen (0,5-10/10-100/100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (D)
Quatriperm-Schale	Nalge Nunc International, New York, NY (USA)
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Rollrandgefäß	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Zellkulturflaschen (25/75/175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Zellkulturplatte mit 24/48/96 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)

Tabelle 20 Labormaterialien

Labormaterialien	Hersteller
Drahtsieb (Specimen baskets)	BAL-TEC AG, Balzers (LIE)
Edelstahlgießformen (24x37x9mm)	Labonord, Mönchengladbach (D)
Eppendorfggefäß (1,5ml/2ml), -ständer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Färbesystem 1) Glaskasten mit Deckel (110x90x80mm) 2) Färberahmen aus Glas (90x70x50mm) 3) Drahtbügel aus Edelstahl	Mercateo, München (D)
Gelkämme, -kammern, -schlitten	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
Gestell für Reaktionsgefäße und Zentrifugenröhrchen	neoLab, Heidelberg (D)
Glasflaschen (50, 100, 250 ml)	Schott, Mainz (D)
Glaspipetten (2, 5, 10, 25ml)	Brand, Wertheim (D)
Glaswaren	Schott AG, Mainz (D)
Pinzetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim (D)
Trichter, Gefäßständer, Tubes	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettierhilfe Pipet-Boy	Brand, Wernheim (D)

Labormaterialien	Hersteller
Raster-Tischchen	Plano GmbH, Wetzlar (D)

7.1.3 Chemikalien, Nährmedien und Zusätze

Tabelle 21 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Aqua (H ₂ O)	B.Braun, Melsungen (D)
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Cacodylat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
DAPI Fluoromount-G™	SouthernBiotech, Birmingham, AL(USA)
DNA-Ladepuffer Orange G 6x	PeqLab Biotechnology, Erlangen (D)
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Entellan, org. Eindeckmittel	Merck, Darmstadt (D)
Epon 812	Serca, Eppelheim (D)
Essigsäure (Acetic acid, 0,5 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Ethanol, absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Ethidiumbromid (EB, 1%)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Feulgen-Farblösung (fuchsinschweflige Säure)	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Fibrinogen (from bovine plasma)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Fibronektin (0,1%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Fluorescein Diacetat (FDA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Fungizone (Amphotericin B, 250µg/ml)	Gibco®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Glutaraldehyd (6,25%, 2,5%)	Merck KgaA, Darmstadt (D)
Hämalaun	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
HCl (Hydrochlorid acid 37%, 1M)	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

Chemikalien	Hersteller
Laminin (1%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
LE Agarosepulver	Biozym Scientific, Oldendorf (D)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , 50 mM)	Bioline GmbH, Luckenwalde (D)
Mastermix PCR	Bioline GmbH, Luckenwalde (D)
NaCl (Natriumchlorid, 0,9%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Natriumdesoxycholat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Natriumdisulfit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Natriumphosphatpuffer (0,1M)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
O.C.T™ Tissue Tek®	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude (NL)
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Science Services, München (D)
Paraffin, Roti-Plast	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Pepsin (0,1mg/ml in 0,5 M Essigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Pronase K	DAKO Cytomation, Eching (D)
Pronase X	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Propylenoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Reinstwasser	Milipore, Schwalbach (D)
RNAlater®	Ambion, Austin, TX (USA)
Salzsäure (HCl, 37%, 1 M)	VWR, Darmstadt (D)
Taq-Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde (D)
Triton X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Trypsin-EDTA (0,25%)	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Dreieich (D)
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Uranylacetat (0,5%)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
VE-Wasser (demineralisiertes Wasser)	Universitätsklinikum Würzburg (D)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 3%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)

Chemikalien	Hersteller
Xylenes (Xylol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

Tabelle 22 Nährmedien und Zusätze

Medien	Zusammensetzung	Hersteller
Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)		PromoCell, Heidelberg (D)
DNase I Lösung	Tris-HCL, pH 7,5, 50 mM 1 mg/ml BSA	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM-Pulver (+ Glucose 4500 mg/l) 13,38g/l NaHCO ₃ 3,7 g/l Gelöst in Reinstwasser pH 7,2	Gibco®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Eosin	Eosin 10 mg/ml Reinstwasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Fetales Kälberserum (FCS)		Linaris, Werthheim-Bettingen (D)
Fibroblast Culture Medium	DMEM 13,38 g/l NaHCO ₃ 3,7g/l FCS 100 ml (10%) pH 7,2	CeLLnTEC, Bern (CH)
Hämalaun	Hämatoxylin 1,2g/l Natriumjodat 0,2 g/l Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat 20 g/l Chloralhydrat 20 g/l Zitronensäure 1g/l Gelöst in VE- Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
HCl/EtOH (HE Färbung)	HCl, 1M, 6,85% In Ethanol (50%)	VWR, Darmstadt (D)
Penicillin-Streptomycin	1000 U/ 1000 µg/ml	Biochrom GmbH, Berlin (D)
PFA 4%	Paraformaldehyde 40g/l In PBS ⁻ Lösung, pH 7,4	AppliChem, Darmstadt (D)
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMIM) 1640		Biochrom GmbH, Berlin (D)

Medien	Zusammensetzung	Hersteller
Sörensenpuffer	KH ₂ PO ₄ 100mM 20% + Na ₂ HPO ₄ 100mM 80%	AppliChem Darmstadt (D)
TAE-Puffer	Tris 242 g Eisessig 100% (Acetic acid) 57,1 ml 0,5 M Na ₂ EDTA/pH 8,0 100 ml	BioRad Laboratories GmbH, München (D) Carl Roth, Karlsruhe (D) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

7.1.4 Software, Antikörper, Kits, Primer

Tabelle 23 Software für Analysegeräte

Software	Hersteller
Megacapt	Vilber Lourmat, Eberhardzell (D)
Step-One™ Bio-Rad Real-Time-System	BioRad Laboratories GmbH, München (D)
Step One™ Real-Time PCR	Life Technologies GmbH, Darmstadt (D)
Tecan i-control 1.7	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim (D)

Tabelle 24 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor®488, goat anti-rabbit	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA (USA)
Alexa Fluor®555, goat anti-rabbit	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA (USA)
Alexa Fluor®647, goat anti-mouse	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA (USA)
Aquaporin 5, mouse	Abcam, Milton (GB)
α-Amylase, rabbit	Biomeda, Burgwedel (D)
Pan-Cytokeratin, rabbit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

Tabelle 25 Kits

Kit	Hersteller
Fastin™ Elastin Assay: Fastin-Farbstoffreagenz (fastin dye reagent) Elastin-Präzipitationsreagenz (elastin precipitating reagent) Elastin Standard (1mg/ml in 0,25 M Oxalsäure) Farbstoff-Dissoziationsreagenz (dye dissociation reagent) Oxalsäure (oxalic acid 1,0 M)	Biocolor life science assays, Carrickfergus, Antrim (UK)
Gallensäuretest (Total Bile Acids Assay Kit): Thio-NAD-Lösung (R1) 3-α-HSD-Lösung (R2) Konjugierte Cholsäure (Kalibrator)	Diazyme Laboratories, Gregg Court Poway, CA (USA)
HyStem® Hydrogel Trial Kit: Glycosil® (Thiol-modifizierte Hyaluronsäure) Gelin™ (Thiol-modifiziertes Gelatin) Extralink® (Polyethylenglykol Diacrylat)	Biotime Inc., Alameda, CA (USA)
iScript cDNA Synthese Kit: iScript Reaktionsmischung iScript Reverse Transkriptase Nuklease freies H ₂ O	Biorad Laboratories GmbH, München (D)
RNeasy Mini Kit: RNeasy MinElute Spin-Säule Sammelröhrchen (2 ml/1,5 ml)	Quiagen GmbH, Hilden (D)

Kit	Hersteller
RLT-Puffer RW1-Puffer RPE-Puffer RDD-Puffer RNase freies H ₂ O Quiazol Lysis Reagenz	Quiagen GmbH, Hilden (D)
Sircol™ Soluble Collagen Assay: Alkali Reagenz (alkali reagent) Säuresalz-Waschreagenz (acid-salt wash reagent) Referenz-Standard Sircol Farbstoffreagenz (Sircol dye reagent)	Biocolor life science assays, Carrickfergus, Antrim (UK)
Tissucol Duo S 1ml Immuno-Kit, Fibrinkleber: Kleberproteinlösung mit Aprotinin Thrombinlösung mit Kaliumchlorid	Baxter, Unterschleißheim (D)

Tabelle 26 Primer

Primer	Hersteller
α-Amylase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
Aquaporin 5	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
Cytokeratin 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
EF1α	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)
GAPDH	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich (D)

7.2 Tabellen der Messergebnisse

7.2.1 PCR-Ergebnisse

Tabelle 27 CT-Werte des humanen Parotisdgewebes der Patienten A und B in Duplikaten

Patient	Amylase	Aquaporin 5	Cytokeratin 18	GAPDH	
A	1	31,71	39,17	23,94	23,05
	2	31,31	36,73	22,62	22,73
B	1	16,02	30,07	25,61	23,51
	2	15,92	29,63	25,74	23,37

Tabelle 28 CT-Werte der *in vitro* kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Passagen 1-3 in Duplikaten für α -Amylase

Patient	Passage	GAPDH	EF1a	α -Amylase
1	1	21,28	19,02	30,91
		21,23	19,02	30,96
	2	20,29	19,53	23,29
		20,06	18,18	23,08
	3	33,89	19,22	37,53
		32,84	18,89	35,54
2	1	20,2	19,42	30,47
		20,74	19,32	30,53
	2	19,95	19,95	30,39
		20,39	19,56	30,96
	3	20,11	19,15	29,62
		20,06	19,45	29,62
3	1	20,63	18,13	32,38
		22,19	18,26	32,39
	2	22,53	18,17	31,65
		21,3	18,7	31,34
	3	21,42	18,09	29,61
		22,13	18,38	30,38

Tabelle 29 CT-Werte der *in vitro* kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Passagen 1-3 in Duplikaten für Cytokeratin 18

Patient	Passage	GAPDH	EF1a	Cytokeratin 18
1	1	21,28	19,02	23,29
		21,23	19,02	23,21
	2	20,29	19,53	24,1
		20,06	18,18	24,1
	3	33,89	19,22	25,14
		32,84	18,89	25,14
2	1	20,2	19,42	22,7
		20,74	19,32	22,7
	2	19,95	19,95	23,39
		20,39	19,56	23,39
	3	20,11	19,15	23,67
		20,06	19,45	23,75
3	1	20,63	18,13	22,2
		22,19	18,26	22,19
	2	22,53	18,17	23,15
		21,3	18,7	23,5
	3	21,42	18,09	23,89
		22,13	18,38	23,84

Tabelle 30 CT-Werte der *in vitro* kultivierten humanen Parotiszellen der Patienten 1-3 der Passagen 1-3 in Duplikaten für Aquaporin 5

Patient	Passage	GAPDH	EF1a	Aquaporin 5
1	1	21,28	19,02	39,94
		21,23	19,02	38,03
	2	20,29	19,53	36,26
		20,06	18,18	37,29
	3	33,89	19,22	0
		32,84	18,89	37,24
2	1	20,2	19,42	37,38
		20,74	19,32	0
	2	19,95	19,95	36,89
		20,39	19,56	39,26
	3	20,11	19,15	37,38
		20,06	19,45	0
3	1	20,63	18,13	38,43
		22,19	18,26	0
	2	22,53	18,17	0
		21,3	18,7	37,94
	3	21,42	18,09	0
		22,13	18,38	37,42

7.2.2 Immunfluoreszenz

Tabelle 31 α -Amylase-, Pan-Cytokeratin-, Aquaporin 5-Gehalt in % der humanen Parotiszellen von Passage 1-3 von den Patienten 1-10

Patient	Passage	α -Amylase-Gehalt in %	Pan-Cytokeratin-Gehalt in %	Aquaporin 5-Gehalt in %
1	1	88,26	84,67	0
	2	88,54	83,5	0
	3	32,4	78,4	0
2	1	85,4	100,0	0
	2	75,55	97,0	0
	3	78,8	98,0	0
3	1	7,2	78,35	0
	2	6,1	82	0
	3	6,2	79,87	0
4	1	31,76	88,26	0
	2	14,89	88,54	0
	3	4,31	32,4	0
5	1	9,25	58,6	0
	2	10,35	37,95	0
	3	8,37	42,36	0
6	1	54,63	87,7	0
	2	24,44	91,3	0
	3	66,25	78,5	0
7	1	100,0	91,3	0
	2	89,78	86,0	0
	3	87,66	87,66	0
8	1	86,73	100,0	0
	2	75,73	95,6	0
	3	90,86	98,0	0
9	1	16,27	55,8	0
	2	13,74	60,6	0
	3	15,03	56,15	0
10	1	97,0	100,0	0
	2	94,7	98,67	0
	3	99,5	99,0	0

7.2.3 Werte der Messkurven

Tabelle 32 Gemessene Werte für die Messkurve der Standardreihe des Quanti-IT™ PicoGreen® dsDNA Assays

Schritte	Standardreihe ng/ml	nm
1	0	30
2	1	105
3	10	657
4	100	5983
5	200	11987
6	300	17992
7	400	23179
8	500	31837
9	600	31837
10	800	32380
11	1000	42003

Tabelle 33 Gemessene Werte für die Messkurve der Standardreihe des Fastin™ Elastin-Assays

Schritte	Standardreihe in µg	nm
1	0	0
2	0	0
3	5	0,537
4	5	0,4675
5	12,5	0,6515
6	12,5	0,7553
7	25	0,9064
8	25	0,9984

Tabelle 34 Gemessene Werte für die Messkurve der Standardreihe des Sircol™ Soluble Collagen-Assays

Schritte	Standardreihe in µg	nm
1	0	0,0597
2	0	0,0597
3	5	0,2483
4	5	0,2521
5	10	0,469
6	10	0,4611
7	15	0,6892
8	15	0,6897
9	30	1,1666
10	30	1,1949
11	50	1,9801
12	50	1,9613

8 Literaturverzeichnis

- Aframian, D. J., Cukierman, E., Nikolovski, J., Mooney, D. J., Yamada, K. M., Baum, B. J. (2000). The growth and morphological behavior of salivary epithelial cells on matrix protein-coated biodegradable substrata. *Tissue Eng*, 6(3), 209-216.
- Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 542(Pt 1), 3-16.
- Ahmed, T. A., Dare, E. V., Hincke, M. (2008). Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 14(2), 199-215.
- Ahn, S. M., Chan, J. Y., Zhang, Z., Wang, H., Khan, Z., Bishop, J. A., Califano, J. A. (2014). Saliva and Plasma Quantitative Polymerase Chain Reaction-Based Detection and Surveillance of Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*.
- American Cancer Society: Cancer facts and figures 2013. Atlanta.GA: American Cancer Society: 2013
- Amosson, C. M., Teh, B. S., Van, T. J., Uy, N., Huang, E., Mai, W. Y., Butler, E. B. (2003). Dosimetric predictors of xerostomia for head-and-neck cancer patients treated with the smart (simultaneous modulated accelerated radiation therapy) boost technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 56(1), 136-144.
- Andreassen, C. N., Grau, C., Lindegaard, J. C. (2003). Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*, 13(1), 62-72.
- Ang, K., Garden, A.(2002) eds. Radiotherapy for Head and Neck Cancer, Indications and Techniques. 2nd ed. New York, NY: Lippincott Williams and Wilkins
- Arenas-Herrera, J. E., Ko, I. K., Atala, A., Yoo, J. J. (2013). Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomed Mater*, 8(1), 014106.
- Badylak, S. F. (2005). Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix. *Anat Rec B New Anat*, 287(1), 36-41.
- Badylak, S. F., Taylor, D., Uygun, K. (2011). Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*, 13, 27-53.
- Baker, O. J. (2010). Tight junctions in salivary epithelium. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 278948.
- Baptista, P. M., Siddiqui, M. M., Lozier, G., Rodriguez, S. R., Atala, A., Soker, S. (2011). The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*, 53(2), 604-617.
- Barber, G. N. (2011). Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol*, 23(1), 10-20.
- Baum, B. J., Tran, S. D. (2006). Synergy between genetic and tissue engineering: creating an artificial salivary gland. *Periodontol 2000*, 41, 218-223.

- Bensaid, W., Triffitt, J. T., Blanchat, C., Oudina, K., Sedel, L., & Petite, H. (2003). A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, *24*(14), 2497-2502.
- Blom, M., Dawidson, I., Fernberg, J. O., Johnson, G., Angmar-Mansson, B. (1996). Acupuncture treatment of patients with radiation-induced xerostomia. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, *32b*(3), 182-190.
- Boheler, K. R., Joodi, R. N., Qiao, H., Juhasz, O., Urick, A. L., Chuppa, S. L., Zhou, R. (2011). Embryonic stem cell-derived cardiomyocyte heterogeneity and the isolation of immature and committed cells for cardiac remodeling and regeneration. *Stem Cells Int*, *2011*, 214203.
- Boing, A. F., Antunes, J. L., de Carvalho, M. B., de Gois Filho, J. F., Kowalski, L. P., Michaluart, P., Jr., Wunsch-Filho, V. (2011). How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health*, *65*(8), 709-714.
- Brown, B., Lindberg, K., Reing, J., Stolz, D. B., Badylak, S. F. (2006). The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng*, *12*(3), 519-526.
- Brown, B. N., & Badylak, S. F. (2014). Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Transl Res*, *163*(4), 268-285.
- Bucheler, M. (2001). [The development of biotechnological therapeutic methods for the causal treatment of the radiogenic xerostomia]. *Laryngorhinootologie*, *80*(11), 637-638.
- Bucheler, M., Wirz, C., Schutz, A., Bootz, F. (2002). Tissue engineering of human salivary gland organoids. *Acta Otolaryngol*, *122*(5), 541-545.
- Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Curado, M. P., Ferlay, J., Franceschi, S., Gillison, M. L. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*, *31*(36), 4550-4559.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, *1*(2), 581-585.
- Chuang, S. C., Jenab, M., Heck, J. E., Bosetti, C., Talamini, R., Matsuo, K., Hashibe, M. (2012). Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes Control*, *23*(1), 69-88.
- Conway, D. I., Hashibe, M., Boffetta, P., Wunsch-Filho, V., Muscat, J., La Vecchia, C., Winn, D. M. (2009). Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncol*, *45*(9), 743-746.
- Cotrim, A. P., Sowers, A., Mitchell, J. B., Baum, B. J. (2007). Prevention of irradiation-induced salivary hypofunction by microvessel protection in mouse salivary glands. *Mol Ther*, *15*(12), 2101-2106.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, *32*(12), 3233-3243.

- Dardick, I., Dardick, A. M., MacKay, A. J., Pastolero, G. C., Gullane, P. J., 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(3), 307-318.
- Delporte, C., Miller, G., Kagami, H., Lillibridge, C. D., O'Connell, B. C., Atkinson, J. C., Baum, B. J. (1998). Safety of salivary gland-administered replication-deficient recombinant adenovirus in rats. *J Oral Pathol Med*, 27(1), 34-38.
- DeNeve, W. J., Everett, C. K., Suminski, J. E., Valeriote, F. A. (1988). Influence of WR2721 on DNA cross-linking by nitrogen mustard in normal mouse bone marrow and leukemia cells in vivo. *Cancer Res*, 48(21), 6002-6005.
- Deng, C. F., Liu, Y., Tan, X. X., Zhou, Q., Huang, S. H., Wang, Y. X., & Xu, T. (2004). [The development and ultrastructure study of acellular submandibular gland scaffold]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 13(1), 48-50.
- Deng, C. F., Tan, X. X., Zhou, Q., Huang, S. H., Xu, Z. F., Wang, Y. X. (2004). [The development and collagen ingredients analysis of submandibular gland acellular matrix]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 13(6), 528-530.
- Dirix, P., Nuyts, S., Van den Bogaert, W. (2006). Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a literature review. *Cancer*, 107(11), 2525-2534.
- DKG Krebsgesellschaft, Onko Internetportal: Kopf-Hals-Tumoren.
- Eisbruch, A., Kim, H. M., Terrell, J. E., Marsh, L. H., Dawson, L. A., Ship, J. A. (2001). Xerostomia and its predictors following parotid-sparing irradiation of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50(3), 695-704.
- Engsig, F. N., Gerstoft, J., Kronborg, G., Larsen, C. S., Pedersen, G., Pedersen, C., Obel, N. (2011). Head and neck cancer in HIV patients and their parents: a Danish cohort study. *Clin Epidemiol*, 3, 217-227.
- Epstein, J. B., Emerton, S., Kolbinson, D. A., Le, N. D., Phillips, N., Stevenson-Moore, P., Osoba, D. (1999). Quality of life and oral function following radiotherapy for head and neck cancer. *Head Neck*, 21(1), 1-11.
- Eyrich, D., Brandl, F., Appel, B., Wiese, H., Maier, G., Wenzel, M., Blunk, T. (2007). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*, 28(1), 55-65.
- Feulgen, R., Rossenbeck, H. (1924). Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in Mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem.* 135: 203-248.
- Fisher, J., Scott, C., Scarantino, C. W., Leveque, F. G., White, R. L., Rotman, M., 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(3), 832-836.
- Franzen, L., Funegard U., Ericson T., Henriksson R. (1992). Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck: a consecutive study of salivary flow and patient discomfort *Eur J Cancer*. 28:457-462.
- Gao, Z., Wu, T., Xu, J., Liu, G., Xie, Y., Zhang, C., Wang, S. (2014). Generation of Bioartificial Salivary Gland Using Whole-Organ Decellularized Bioscaffold. *Cells Tissues Organs*, 200(3-4), 171-180.

- Gilbert, T. W. (2012). Strategies for tissue and organ decellularization. *J Cell Biochem*, 113(7), 2217-2222.
- Gilbert, T. W., Freund, J. M., Badylak, S. F. (2009). Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res*, 152(1), 135-139.
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683.
- Gu, J., Zhu, S., Li, X., Wu, H., Li, Y., 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(5), e95968.
- Guyette, J. P., Charest, J. M., Mills, R. W., Jank, B. J., Moser, P. T., Gilpin, S. E., Ott, H. C. (2016). Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res*, 118(1), 56-72.
- Hagen, R., Scheich, M., Kleinsasser, N., Burghartz, M. (2015). Two-stage autotransplantation of human submandibular gland: a novel approach to treat postradiogenic xerostomia. *Eur Arch Otorhinolaryngol*.
- Hahnel, S., Behr, M., Handel, G., Burgers, R. (2009). Saliva substitutes for the treatment of radiation-induced xerostomia--a review. *Support Care Cancer*, 17(11), 1331-1343.
- Hardman, P., Spooner, B. S. (1992). Localization of extracellular matrix components in developing mouse salivary glands by confocal microscopy. *Anat Rec*, 234(3), 452-459.
- Hiles, M., Hodde, J. (2006). Tissue engineering a clinically useful extracellular matrix biomaterial. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 17 Suppl 1, S39-43.
- Hiraki, A., Shirasuna, K., Ikari, T., Shinohara, M., Garrod, D. R. (2002). Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells. *J Cell Physiol*, 193(1), 55-63.
- Jabbari, S., Kim, H. M., Feng, M., Lin, A., Tsien, C., Elshaikh, M., Eisbruch, A. (2005). Matched case-control study of quality of life and xerostomia after intensity-modulated radiotherapy or standard radiotherapy for head-and-neck cancer: initial report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 63(3), 725-731.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2), 69-90.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Thun, M. J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, 57(1), 43-66.
- Jha, N., Seikaly, H., McGaw, T., Coulter, L. (2000). Submandibular salivary gland transfer prevents radiation-induced xerostomia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 46(1), 7-11.
- Johnstone, P. A., Peng, Y. P., May, B. C., Inouye, W. S., Niemtow, R. C. (2001). Acupuncture for pilocarpine-resistant xerostomia following radiotherapy for head and neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50(2), 353-357.
- Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J., Atala, A. (2007). In-vitro reconstitution of three-dimensional human salivary gland tissue structures. *Differentiation*, 75(4), 318-324.
- Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J. J., Atala, A. (2005). Tissue engineering of functional salivary gland tissue. *Laryngoscope*, 115(2), 244-248.

- Kagami, H., Wang, S., Hai, B. (2008). Restoring the function of salivary glands. *Oral Dis*, 14(1), 15-24.
- Kanematsu, A., Yamamoto, S., Ozeki, M., Noguchi, T., Kanatani, I., Ogawa, O., Tabata, Y. (2004). Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. *Biomaterials*, 25(18), 4513-4520.
- Kielbassa, A. M., Shohadai, S. P., Schulte-Monting, J. (2001). Effect of saliva substitutes on mineral content of demineralized and sound dental enamel. *Support Care Cancer*, 9(1), 40-47.
- Kim, W. R., Smith, J. M., Skeans, M. A., Schladt, D. P., Schnitzler, M. A., Edwards, E. B., Kasiske, B. L. (2014). OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: liver. *Am J Transplant*, 14 Suppl 1, 69-96.
- Kleinman, H. K., Martin, G. R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15(5), 378-386. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.004
- Koukourakis, M. I. (2003). Amifostine: is there evidence of tumor protection? *Semin Oncol*, 30(6 Suppl 18), 18-30.
- Kück, U., Bunse, A., Holländer-Czytko, H., Jeske, S., Klämbt, C. (2004). Praktikum der Molekulargenetik. Springer-Verlag. S.221-241.
- Kumar, H. S., Bihani, V., Kumar, V., Chaudhary, R. K., Kumar, L., Punia, D. P. (1992). Osteoradionecrosis of mandible in patients treated with definitive radiotherapy for carcinomas of oral cavity and oropharynx. A retrospective study. *Indian J Dent Res*, 3(2), 47-50.
- Lenander-Lumikari, M., Loimaranta, V. (2000). Saliva and dental caries. *Adv Dent Res*, 14, 40-47.
- Leyh, R., Wilhelmi, M., Haverich, A., Mertsching, H. (2003). [A xenogeneic acellularized matrix for heart valve tissue engineering: in vivo study in a sheep model]. *Z Kardiol*, 92(11), 938-946.
- Lian, X., Hsiao, C., Wilson, G., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Azarin, S. M., Palecek, S. P. (2012). Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(27), E1848-1857.
- Lichtenberg, A., Dumlu, G., Walles, T., Maringka, M., Ringes-Lichtenberg, S., Ruhparwar, A., Haverich, A. (2005). A multifunctional bioreactor for three-dimensional cell (co)-culture. *Biomaterials*, 26(5), 555-562.
- Liem, I. H., Olmos, R. A., Balm, A. J., Keus, R. B., van Tinteren, H., Takes, R. P., Hilgers, F. J. (1996). Evidence for early and persistent impairment of salivary gland excretion after irradiation of head and neck tumours. *Eur J Nucl Med*, 23(11), 1485-1490.
- Lin, C. Y., Lee, B. S., Liao, C. C., Cheng, W. J., Chang, F. M., Chen, M. H. (2007). Transdifferentiation of bone marrow stem cells into acinar cells using a double chamber system. *J Formos Med Assoc*, 106(1), 1-7.
- Linke, K., Schanz, J., Hansmann, J., Walles, T., Brunner, H., Mertsching, H. (2007). Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Eng*, 13(11), 2699-2707.

- Logemann, J. A., Pauloski, B. R., Rademaker, A. W., Lazarus, C. L., Mittal, B., Gaziano, J., Newman, L. A. (2003). Xerostomia: 12-month changes in saliva production and its relationship to perception and performance of swallow function, oral intake, and diet after chemoradiation. *Head Neck*, 25(6), 432-437.
- Lombaert, I. M., Wierenga, P. K., Kok, T., Kampinga, H. H., deHaan, G., 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(6), 1804-1812.
- Lu, T. Y., Lin, B., Kim, J., Sullivan, M., Tobita, K., Salama, G., Yang, L. (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun*, 4, 2307.
- Maes, A., Huygh, I., Weltens, C., Vandeveld, G., Delaere, P., Evers, G., Van den Bogaert, W. (2002). De Gustibus: time scale of loss and recovery of tastes caused by radiotherapy. *Radiother Oncol*, 63(2), 195-201.
- Maria, O. M., Zeitouni, A., Gologan, O., Tran, S. D. (2011). Matrigel improves functional properties of primary human salivary gland cells. *Tissue Eng Part A*, 17(9-10), 1229-1238.
- Matsuzaki, T., Tajika, Y., Tserentsoodol, N., Suzuki, T., Aoki, T., Hagiwara, H., Takata, K. (2002). Aquaporins: a water channel family. *Anat Sci Int*, 77(2), 85-93.
- Mertsching, H., Schanz, J., Steger, V., Schandar, M., Schenk, M., Hansmann, J., Walles, T. (2009). Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation*, 88(2), 203-210.
- Mertsching, H., Weimer, M., Kersen, S., Brunner, H. (2008). Human skin equivalent as an alternative to animal testing. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 3(1), Doc11.
- Miyamoto, S., Katz, B. Z., Lafrenie, R. M., & Yamada, K. M. (1998). Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 857, 119-129.
- Moser, P. T., Ott, H. C. (2014). Recellularization of organs: what is the future for solid organ transplantation? *Curr Opin Organ Transplant*, 19(6), 603-609.
- Nakamura, M., Saga, T., Watanabe, K., Takahashi, N., Tabira, Y., Kusukawa, J., Yamaki, K. (2013). An immunohistochemistry-based study on aquaporin (AQP)-1, 3, 4, 5 and 8 in the parotid glands, submandibular glands and sublingual glands of Sjogren's syndrome mouse models chronically administered cevimeline. *Kurume Med J*, 60(1), 7-19.
- Ott, H. C. (2015). Perfusion Decellularization of Discarded Human Kidneys: A Valuable Platform for Organ Regeneration. *Transplantation*, 99(9), 1753.
- Ott, H. C., Clippinger, B., Conrad, C., Schuetz, C., Pomerantseva, I., Ikonomou, L., Vacanti, J. P. (2010). Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med*, 16(8), 927-933.
- Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., Taylor, D. A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*, 14(2), 213-221.

- Parliament, M. B., Scrimger, R. A., Anderson, S. G., Kurien, E. C., Thompson, H. K., Field, G. C., Hanson, J. (2004). Preservation of oral health-related quality of life and salivary flow rates after inverse-planned intensity- modulated radiotherapy (IMRT) for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(3), 663-673.
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis*, 8(3), 117-129.
- Petersen, T. H., Calle, E. A., Zhao, L., Lee, E. J., Gui, L., Raredon, M. B., Niklason, L. E. (2010). Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, 329(5991), 538-541.
- Pradhan-Bhatt, S., Harrington, D. A., Duncan, R. L., Jia, X., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C. (2013). Implantable three-dimensional salivary spheroid assemblies demonstrate fluid and protein secretory responses to neurotransmitters. *Tissue Eng Part A*, 19(13-14), 1610-1620.
- Pradhan, S., Liu, C., Zhang, C., Jia, X., Farach-Carson, M. C., Witt, R. L. (2010). Lumen formation in three-dimensional cultures of salivary acinar cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 142(2), 191-195.
- Rades, D., Fehlauer, F., Bajrovic, A., Mahlmann, B., Richter, E., Alberti, W. (2004). Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients. *Radiother Oncol*, 70(3), 261-264.
- Raya-Rivera, A. M., Esquiliano, D., Fierro-Pastrana, R., Lopez-Bayghen, E., Valencia, P., Ordorica-Flores, R., Atala, A. (2014). Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. *Lancet*, 384(9940), 329-336.
- Righini, C. A., Karkas, A., Morel, N., Soriano, E., Reyt, E. (2008). [Risk factors for cancers of the oral cavity, pharynx (cavity excluded) and larynx]. *Presse Med*, 37(9), 1229-1240.
- Robert-Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2011/2012
- Ross, E. A., Williams, M. J., Hamazaki, T., Terada, N., Clapp, W. L., Adin, C., Batich, C. D. (2009). Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol*, 20(11), 2338-2347.
- Rotter, N., Schwarz, S., Jakob, M., Brandau, S., Wollenberg, B., Lang, S. (2010). [Salivary gland stem cells : Can they restore radiation-induced salivary gland dysfunction?]. *Hno*, 58(6), 556-563.
- Saibishkumar, E. P., Jha, N., Scrimger, R. A., MacKenzie, M. A., Daly, H., Field, C., 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(1), 98-104.
- Saksela, O., Moscatelli, D., Sommer, A., Rifkin, D. B. (1988). Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol*, 107(2), 743-751.
- Scannapieco, F. A., Torres, G., Levine, M. J. (1993). Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4(3-4), 301-307.
- Schanz, J., Pusch, J., Hansmann, J., Walles, H. (2010). Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol*, 148(1), 56-63.

- Schenke-Layland, K. (2011). From tissue engineering to regenerative medicine--the potential and the pitfalls. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(4-5), 193-194.
- Schupbach, P., Oppenheim, F. G., Lendenmann, U., Lamkin, M. S., Yao, Y., Guggenheim, B. (2001). Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *Eur J Oral Sci*, 109(1), 60-68.
- Schwarzbauer, J. (1999). Basement membranes: Putting up the barriers. *Curr Biol*, 9(7), R242-244.
- Seifert GMA., Haubrich J., Chilla R (1984) In: Chillar R (Hrsg) Speicheldrüsenkrankheiten. Thieme, Stuttgart, S. 140-146.
- Sellaro, T. L., Ranade, A., Faulk, D. M., McCabe, G. P., Dorko, K., Badylak, S. F., Strom, S. C. (2010). Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. *Tissue Eng Part A*, 16(3), 1075-1082.
- Shaikh, F. M., Callanan, A., Kavanagh, E. G., Burke, P. E., Grace, P. A., McGloughlin, T. M. (2008). Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 188(4), 333-346.
- Shannon, I. L., Trodahl, J. N., Starcke, E. N. (1978). Radiosensitivity of the human parotid gland. *Proc Soc Exp Biol Med*, 157(1), 50-53.
- Smith, G., Smith, A. J., Shaw, L., Shaw, M. J. (2001). Artificial saliva substitutes and mineral dissolution. *J Oral Rehabil*, 28(8), 728-731.
- Sneddon, J. B., Borowiak, M., Melton, D. A. (2012). Self-renewal of embryonic-stem-cell-derived progenitors by organ-matched mesenchyme. *Nature*, 491(7426), 765-768.
- Snow, A. N., Laudadio, J. (2010). Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol*, 17(6), 394-403.
- Song, J. J., Ott, H. C. (2011). Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med*, 17(8), 424-432.
- Sonis, S. T., Fey, E. G. (2002). Oral complications of cancer therapy. *Oncology (Williston Park)*, 16(5), 680-686; discussion 686, 691-682, 695.
- Soto-Gutierrez, A., Zhang, L., Medberry, C., Fukumitsu, K., Faulk, D., Jiang, H., Badylak, S. F. (2011). A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods*, 17(6), 677-686.
- Spak, C. J., Johnson, G., Ekstrand, J. (1994). Caries incidence, salivary flow rate and efficacy of fluoride gel treatment in irradiated patients. *Caries Res*, 28(5), 388-393.
- Spencer, C. M., & Goa, K. L. (1995). Amifostine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drugs*, 50(6), 1001-1031.
- Spiegel, J. H., Deschler, D. G., Cheney, M. L. (2001). Microvascular transplantation and replantation of the rabbit submandibular gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 127(8), 991-996.
- Spiegel, J. H., Zhang, F., Levin, D. E., Singer, M. I., Buncke, H. J. (2000). Microvascular transplantation of the rat submandibular gland. *Plast Reconstr Surg*, 106(6), 1326-1335.

- Sugito, T., Kagami, H., Hata, K., Nishiguchi, H., Ueda, M. (2004). Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. *Cell Transplant*, 13(6), 691-699.
- Susa, T., Sawai, N., Aoki, T., Iizuka-Kogo, A., Kogo, H., Negishi, A., Matsuzaki, T. (2013). Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands. *Acta Histochem Cytochem*, 46(6), 187-197.
- Szlavik, V., Szabo, B., Vicsek, T., Barabas, J., Bogdan, S., Gresz, V., Vag, J. (2008). Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract. *Tissue Eng Part A*, 14(11), 1915-1926.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
- Uygun, B. E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M. L., Guzzardi, M. A., Shulman, C., Uygun, K. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*, 16(7), 814-820.
- Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354 Suppl 1, S132-34.
- Valdez, I. H. (1991). Radiation-induced salivary dysfunction: clinical course and significance. *Spec Care Dentist*, 11(6), 252-255.
- van Berlo, J. H., Kanisicak, O., Maillet, M., Vagnozzi, R. J., Karch, J., Lin, S. C., Molkenkin, J. D. (2014). c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*, 509(7500), 337-341.
- Vissink, A., s-Gravenmade, E. J., Panders, A. K., Vermey, A., Petersen, J. K., Visch, L. L., Schaub, R. M. (1983). A clinical comparison between commercially available mucin- and CMC-containing saliva substitutes. *Int J Oral Surg*, 12(4), 232-238.
- Wainwright, J. M., Czajka, C. A., Patel, U. B., Freytes, D. O., Tobita, K., Gilbert, T. W., Badylak, S. F. (2010). Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods*, 16(3), 525-532.
- Wallis, T., Giere, B., Hofmann, M., Schanz, J., Hofmann, F., Mertsching, H., Macchiarini, P. (2004). Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128(6), 900-906.
- Wang, Y., Blasioli, D. J., Kim, H. J., Kim, H. S., Kaplan, D. L. (2006). Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials*, 27(25), 4434-4442.
- Wasserman, T. H., Brizel, D. M., Henke, M., Monnier, A., Eschwege, F., Sauer, R., 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(4), 985-990.
- Wong, R. K., Jones, G. W., Sagar, S. M., Babjak, A. F., Whelan, T. (2003). A Phase I-II study in the use of acupuncture-like transcutaneous nerve stimulation in the treatment of radiation-induced xerostomia in head-and-neck cancer patients treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57(2), 472-480.
- Ye, Q., Zund, G., Benedikt, P., Jockenhoevel, S., Hoerstrup, S. P., Sakyama, S., Turina, M. (2000). Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*, 17(5), 587-591.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Univ.-Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen danke ich für das Ermöglichen dieser Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA für die Betreuung dieser Arbeit, für die fachlichen Gespräche, die freundliche, engagierte Unterstützung und mehrmaligen Durchsicht meiner Arbeit.

Herzlichen Dank an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold für das mir entgegengebrachte Vertrauen zur externen Bearbeitung des Themas und für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Marc Burghartz als Betreuer danke ich für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas, die Einarbeitung im Labor, die zahlreichen, fachlichen Diskussionen, vielen guten Ratschläge und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Der Forschungsabteilung des Labors der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg danke ich für die Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und den kollegialen Umgang miteinander. Vor allem möchte ich an dieser Stelle Frau Gudrun Fries, Herrn Michael Kessler, Frau Petra Joa und Frau Renate Port für die Einarbeitung im Labor danken.

Frau Prof. Dr. Heike Walles danke ich dafür, dass ich einen Teil meiner Experimente im Labor des Lehrstuhles für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg durchführen konnte. Bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft bei der Einweisung im Labor. Herr Dr. Marco Metzger, Herr Dr. Matthias Schweinlin und Frau Sabine Wilhelms gilt ein großer Dank für ihre fachliche Unterstützung und aufschlussreichen Gespräche.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Georg Krohne danke ich für die Anfertigungen der Elektronenmikroskopieaufnahmen am Biozentrum der Universität Würzburg.

Ein herzlicher Dank geht an meinen Kollegen Herrn Simon Lennartz, der mir eine große Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Bilder war. Meinem Kollegen Herrn Serge-Peer Ströhle danke ich für die guten Gespräche und die Einarbeitung in das EndNote-Programm.

Ulrike Schweizer, die wie eine Schwester für mich ist, danke ich sehr für ihren moralischen Beistand und ihre liebenswerten Aufmunterungen.

Meinem Bruder Tobias Blaser bin ich sehr dankbar für seine große Hilfe bei der Bearbeitung und technischen Umsetzung meiner Arbeit am Computer.

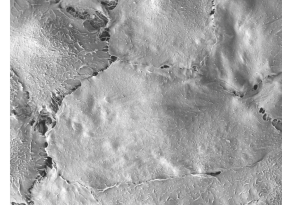
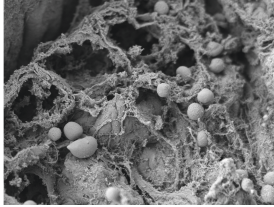
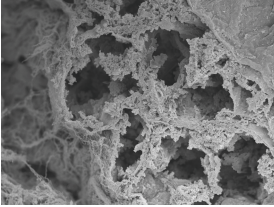
Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglichten und mich während der Anfertigung der Doktorarbeit immer wieder ermutigt und unterstützt haben. Deshalb ist diese Arbeit ihnen gewidmet.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Evelyn Kolb



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6642-0



9 17 8 3 8 3 5 19 6 6 4 2 0