Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Universitätsklinik Ulm

Prof. Dr. Thomas Hoffmann

Isolation und Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus Speicheldrüsen und ihre Differenzierung in Azinuszellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Johannes Holle, Tübingen

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Nicole Rotter

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 09.05.2014

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1
   1.1. Klinischer Hintergrund 1
      1.1.1. Tumoren im Kopf-Hals-Bereich 1
      1.1.2. Anatomie und Physiologie der Speicheldrüsen 2
      1.1.3. Mechanismen der radiogenen Speicheldrüsenschädigung 3
      1.1.4. Xerostomie 4
   1.2. Regenerative Medizin und Stammzelltherapie 5
      1.2.1. Definition von Stammzellen 5
      1.2.2. Adulte Stammzellen 6
         1.2.2.1. Differenzierungspotenzial 7
         1.2.2.2. Immunphänotyp 10
      1.2.3. Aktuelle Stammzelltherapien 11
   1.3. Stammzelltherapie bei Speicheldrüsenschädigung 11
      1.3.1. Differenzierung in Azinuszellen 11
   1.4. Ziele der Arbeit 12

2. Material und Methoden 13
   2.1. Material 13
      2.1.1. Geräte 13
      2.1.2. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien 14
      2.1.3. Chemikalien 15
      2.1.4. Arbeitslösungen 18
      2.1.5. Färbe Kits 18
      2.1.6. Medien und Zusätze 19
      2.1.7. Antikörper 20
      2.1.8. Gewebe für Zellkultur und Patientendaten 21
   2.2. Methoden 22
      2.2.1. Isolation von hSGSC 22
      2.2.2. Kultivierung und Expansion von hSGSC 23
      2.2.3. Kryokonservierung von hSGSC 23
      2.2.4. Immunphänotypische Charakterisierung von hSGSC mittels FACS 24
      2.2.5. Grundlagen der FACS Datenauswertung und Statistik 25
      2.2.6. Zellseparation durch MACS 27
      2.2.7. Differenzierungssysteme 28
      2.2.8. Differenzierung in Azinuszellen 30

2.2.9. Histologische Methoden 32
2.2.10. Immunhistochemische Methoden 35
2.2.11. Gewinnung von Gewebe für eine RNA-Isolation 36
2.2.12. Vergleichende Untersuchungen an hBMSC 38

3. Ergebnisse 39
3.1. Isolation und Kultivierung von hSGSC 39
3.2. Immunphänotypische Charakterisierung der hSGSC 45
3.3. Differenzierungspotenzial der hSGSC 53
3.3.1. Adipogene Differenzierung 53
3.3.2. Chondrogene Differenzierung 56
3.3.3. Osteogene Differenzierung 59
3.4. Differenzierung in Azinuszellen 61
3.5. Gewebebank für RNA-Isolation 69

4. Diskussion 70
4.1. Charakterisierung von hSGSC 70
4.1.1. Wachstumspotenzial der hSGSC 71
4.1.2. Differenzierungspotenzial der hSGSC 72
4.1.3. Immunphänotyp der hSGSC 73
4.2. Differenzierung in Azinuszellen 78
4.3. Ausblick 82

5. Zusammenfassung 83

6. Literaturverzeichnis 84

Danksagung 95

Lebenslauf 96

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aqua
AP-2	Adipocyte Protein 2
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone Marrow Stem cells
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CbfA	C Modul bindender Faktor A
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CD	Cluster of Differentiation
dest.	Destilliert
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fötales Bovines Serum
FcR	Crystallisable fragment receptor
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Light Scatter
GAG	Glykosaminoglykane
G-CSF	Granulocyte - Colony Stimulating Factor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

h	human
HAM's F12	Ham's Nutrient Mixture F12
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin Eosin
HSC	Hematopoietic Stem cells
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxantin
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin like Growth Factor
iPS	induced Pluripotent Stem cells
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
MACS	Magnetic Cell Separation
MHC	Major Histokompatibilitäts Komplex
MSC	Mesenchymal Stem cells
MSCA	Mesenchymal stem cell antigen
NaCl	Natriumchlorid
P	Passage
PAS	Periodic acid Schiff reaction
PBS	Phosphat buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
(m-) RNA	(messenger-) Ribonucleinsäure
SGSC	Salivary Gland Stem cells
SSC	Sideward Light scatter
TGF	Transforming Growth Factor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Es gibt zahlreiche Erkrankungen im Kopf-Halsbereich, welche die Speicheldrüsen schädigen können. Zum einen spielen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich eine große Rolle, da im Rahmen der Therapie dieser Erkrankungen häufig eine radiogene Speicheldrüsenschädigung nicht zu verhindern ist. Zum anderen gibt es Autoimmunerkrankungen wie das Sjögren Syndrom, welche die Speicheldrüsen irreversibel schädigen. In der Folge kommt es häufig zur Xerostomie, der Mundtrockenheit, für die bislang keine kurative Therapie verfügbar ist. Moderne und innovative Therapieansätze kommen aus dem Bereich des Tissue Engineering und der Stammzelltherapie, womit sich auch diese Arbeit befassen wird.

1.1 Klinischer Hintergrund

1.1.1 Tumoren im Kopf-Hals-Bereich

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Europa. Nach Angaben des Robert Koch Instituts litten im Jahr 2012 in Deutschland 258 000 Männer und 228 000 Frauen an einer Krebserkrankung. Die Zahl jährlich neu aufgetretener Krebserkrankungen hat in Deutschland von 1980 bis 2006 um 35% bei Frauen und um mehr als 80% bei Männern zugenommen [67].

Im Kopf-Halsbereich sind vor allem Tumoren in Mundhöhle und Rachen sowie das Larynxkarzinom relevant. In Deutschland sind im Jahr 2008 17130 Menschen an diesen Tumoren erkrankt, wobei in etwa drei von vier Fällen Männer betroffen waren [67]. Häufig ist bei diesen Tumoren zusätzlich zur Operation eine adjuvante Radio- (chemo-) Therapie erforderlich.

Einen Sonderfall stellen die mit 5870 Neuerkrankungen im Jahr 2008 in Deutschland ebenfalls relativ häufigen Neoplasien der Schilddrüse dar, bei welcher im Rahmen der Therapie häufig eine Radiojodtherapie angewendet wird, die ebenfalls zur Xerostomie führen kann [67].

Zu den klassischen Risikofaktoren für die Plattenepithelkarzinome zählen Nikotin- sowie Alkoholabusus; es ist daher nicht überraschend, dass die Häufigkeit dieser Tumoren weiterhin zunimmt. Weltweit wird die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr an Kopf- und Halstumoren auf etwa 500 000 Menschen geschätzt [101].

Trotz Optimierung der Strahlenfelder und Modifikation der Bestrahlungskonzepte kommt es bei einer üblichen, kumulativen Bestrahlungsdosis von 50 bis 70 Gray in 40% bis 50% der Fälle zu postradiogenen Speicheldrüsenschädigungen mit nachfolgender Xerostomie [11,98].

1.1.2 Anatomie und Physiologie der Speicheldrüsen

Die physiologische Produktion des Speichels wird zu über 90% von den drei paarig angelegten großen Speicheldrüsen gewährleistet, den *Glandulae parotidae*, *sublingualis* und *submandibularis*. Darüber hinaus gibt es kleine Speicheldrüsen in der Mundschleimhaut. Speicheldrüsen bestehen aus Endstücken (Azini), Ausführungsgängen sowie kollagenhaltigen Bindegewebssepten [73].

Es werden zwei Arten von Azini unterschieden. Seröse Azini produzieren ein wässriges Sekret, welches α-Amylase enthält. Die zytoplasmatischen Vesikel sind klein, der Zellkern ist groß, rund und zentral gelegen. Muköse Endstücke sind tubulär angeordnet, sezernieren Glykoproteine, verpackt in großen Vesikeln, die den Zellkern nach basal verdrängen. An deren Enden befinden sich häufig seröse Drüsenzellen [73].

Das System der Ausführungsgänge beginnt mit Schaltstücken, welche direkt an den Azini münden. Mehrere dieser Schaltstücke münden in Streifenstücke, die ihren Namen ihrer charakteristischen Einfaltung der basalen Plasmamembran verdanken. Die Streifenstücke münden in interlobuläre Ausführungsgänge und schließlich in die Hauptausführungsgänge der großen Speicheldrüsen [73]. Hauptstimulus für die Produktion von durchschnittlich 1,5 Liter Speichel pro Tag ist das parasympathische Nervensystem. Neben Wasser und Elektrolyten enthält der Speichel auch Amylase, Muzine, IgA und Lysozyme und gewährleistet neben den physiologischen Vorgängen des Sprechens und Schluckens auch den Beginn der Verdauung sowie einen mechanischen, chemischen und bakteriellen Schutz der

Zähne und Mundschleimhaut. Die Entwicklung aller Speicheldrüsen erfolgt aus der ektodermalen Mundbucht durch solide Epithelsprossen der Mundschleimhaut [73].

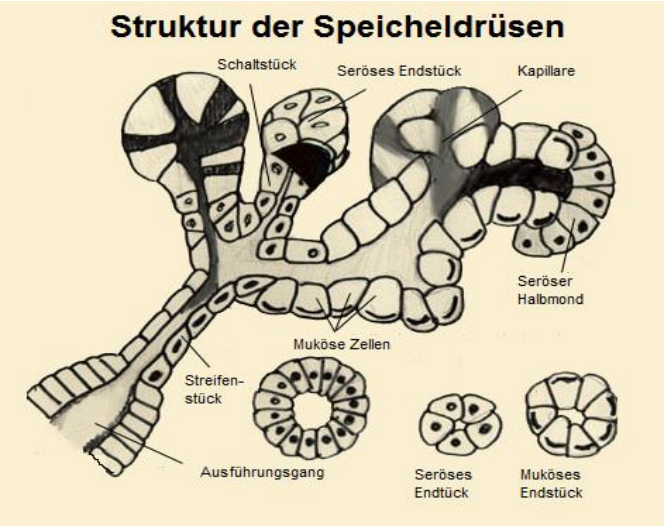


Abb. 1: Struktur der Speicheldrüsen. Seröse und muköse Endstücke sezernieren den Primärspeichel, welcher in den Schalt- und Streifenstücken modifiziert wird. Die Ausführungsgänge transportieren den Speichel in die Mundhöhle. An mukösen Endstücken befindet sich häufig ein seröser Halbmond. Abbildung aus [84], Teile der Abbildung wurden übersetzt.

1.1.3 Mechanismen der radiogenen Speicheldrüsenschädigung

Die Schädigung der Speicheldrüsen im Rahmen einer Strahlentherapie kann nach Untersuchungen an Ratten in vier Phasen eingeteilt werden. Zwischen Tag eins und Tag 10 nach der Radiatio kommt es zu einem Abfall der Speichelproduktion ohne histopathologische Auffälligkeiten. Pathophysiologisch kommt es in dieser Phase zu einer selektiven Störung in der Signaltransduktion und in Folge zu einer verminderten apikalen Wassersekretion der Azinuszellen [18]. In der zweiten Phase zwischen Tag 10 und Tag 60 kommt es zu einem selektiven Verlust von Azinuszellen durch p-53 vermittelte Apoptose [3], wobei duktale Strukturen besser erhalten bleiben als die Azini selbst. In der dritten Phase bis Tag 120 kommt es vorübergehend zu einer teilweisen Regeneration des Gewebes, wobei sich Speichelproduktion und Morphologie der Drüsen kurzfristig stabilisieren. Der irreversible Rückgang der Speicheldrüsenfunktion findet in Phase vier statt. Hierbei kommt es zu terminaler Atrophie der Drüsenläppchen und großflächigen Fibrosen [17,43]. Pathophysiologisch spielt hierbei vermutlich der Verlust der im duktalen Bereich positionierten SGSC eine entscheidende Rolle. Die Homöostase zwischen Apoptose und Regeneration ist gestört [3,17,43,51].

Beim Menschen wurde die radiogene Speicheldrüsenschädigung in drei Phasen unterteilt und entspricht weitgehend den Abläufen der Schädigung im Tiermodell [73]. Pathophysiologisch relevant ist der Zustand der Granulation der Drüsenzellen. Je mehr Granula in den Zellen vorhanden sind, desto schwerwiegender ist die radiogene Schädigung [73]. Dies lässt sich mit in den Granula enthaltenen Stoffen wie Zink, Mangan und Eisen erklären, welche als Redoxsysteme eine Lipidperoxidation unter Bestrahlung katalysieren und somit die Membranen der Granula zerstören. Folge ist die Freisetzung lytischer Enzyme und die Blockade der Zellatmung durch Kalziumeinstrom, was zum Zelluntergang führt. Je nach Bestrahlungsmodalität, das heißt abhängig von Dauer, Intensität und Auswahl der Strahlenfelder, sind bis zu 50% der Patienten betroffen [73].

1.1.4 Xerostomie

Die Xerostomie hat bedeutende Einschränkungen in der Lebensqualität der Patienten zur Folge. Neben subjektiven Beschwerden wie Mundtrockenheit, Schluck- und Sprachbeschwerden kann es auch zu Komplikationen wie oralen Infektionen mit Pilzen und Bakterien bis hin zu einer septischen Streuung der Bakterien mit folgender Osteomyelitis und Endokarditis kommen. Neben der wenig effektiven, rein symptomatischen Therapie mittels gustatorischer oder muskarinerger Stimulation der Speichelproduktion ist bisher kein kausaler Therapieansatz in der klinischen Erprobung [98,99].

Präventive Ansätze beruhen auf der Verabreichung von Cholinergika vor der Bestrahlung, um die Entleerung der Granula zu begünstigen und so die Schädigung der Speicheldrüsen zu reduzieren. Allerdings reichen diese Effekte nicht aus, um ab einer kumulativen Strahlendosis größer als 50 Gray die Xerostomie effektiv zu verhindern. Darüber hinaus leiden die Patienten an cholinergen Nebenwirkungen [73]. Durch Gentherapie mit Ausschaltung des p53 Apoptose Signalweges oder Induktion von Hitze-Schock-Proteinen konnte bislang in Tierexperimenten kein positiver oder protektiver Effekt erzielt werden [3,66].

1.2 Regenerative Medizin und Stammzelltherapie

1.2.1 Definition von Stammzellen

Stammzellen werden über ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Zelltypen definiert. Typisch für Stammzellen ist die asymmetrische Teilung, bei der aus einer Stammzelle eine Vorläuferzelle und eine neue Stammzelle entstehen. Die Vorläuferzelle kann durch weitere Zellteilung und Differenzierung somatische Zellen bilden [46].

Im Rahmen der menschlichen Embryonalentwicklung entsteht aus der befruchteten Eizelle ein komplexer Organismus aus vielen verschiedenen Zelltypen und Geweben. Die Totipotenz der embryonalen Stammzellen, das heißt die Fähigkeit, dass aus nur einer Zelle ein kompletter Organismus entsteht, ist nur für kurze Zeit bis zum 8-Zellstadium, der sogenannten Morula, gegeben. Die embryonalen Stammzellen im Inneren der danach entstehenden Blastozyste, dem Embryoblasten, sind pluripotent. Das bedeutet, sie haben die Fähigkeit sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren [46].

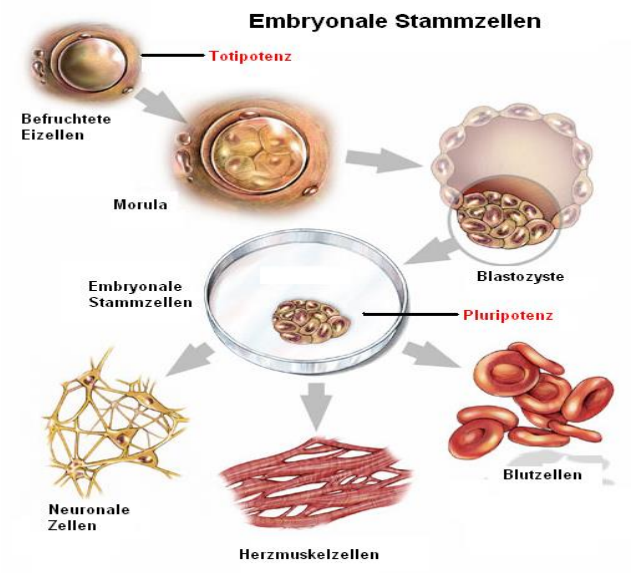


Abb. 2: Eigenschaften von embryonalen Stammzellen. Die Zellen der befruchteten Eizelle haben bis zum Stadium der Morula totipotente Eigenschaften. Embryonale Stammzellen, isoliert aus der entstehenden Blastozyte, haben pluripotente Eigenschaften. Abbildung aus [41], Teile der Abbildung wurden übersetzt und Markierungen hinzugefügt.

Die Gewinnung von embryonalen Stammzellen ist technisch möglich, ethisch allerdings umstritten. In Deutschland ist die Forschung an embryonalen Stammzellen von Kontroversen umgeben und nur unter strengen Auflagen und Kontrollen möglich [91].

1.2.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und multipotenten Differenzierung in Form asymmetrischer Zellteilung. Hierbei wird zwischen den HSC und den MSC unterschieden. HSC befinden sich im Knochenmark, können in Blutzellen ausdifferenzieren und haben daher ein multipotentes Differenzierungspotenzial. In-vitro wachsen sie nicht adhärent auf Zellkulturoberflächen.

Friedenstein et al entdeckte 1970 eine weitere Form von Stammzellen, welche ebenfalls aus dem Knochenmark isoliert werden konnte und adhärent auf Zellkulturoberflächen wuchs [28]. Diese Zellen wurden aus zahlreichen Organen isoliert, so zum Beispiel aus Gastrointestinaltrakt [12], Herz [8,48], Lunge [40], Haut [96], Pankreas [45], Leber [30], Fettgewebe [109], Nabelschnurblut [46] und Mamma [75]. Aufgrund der Morphologie und der Differenzierungseigenschaften in die mesenchymalen Grundgewebe wurden diese Zellen als MSC bezeichnet. Zu den Mindestanforderungen an MSC gehören die Fähigkeiten der Plastikadhärenz, in-vitro Proliferation und multipotenten Differenzierung sowie ein charakteristisches Profil an Oberflächenantigenen [24].

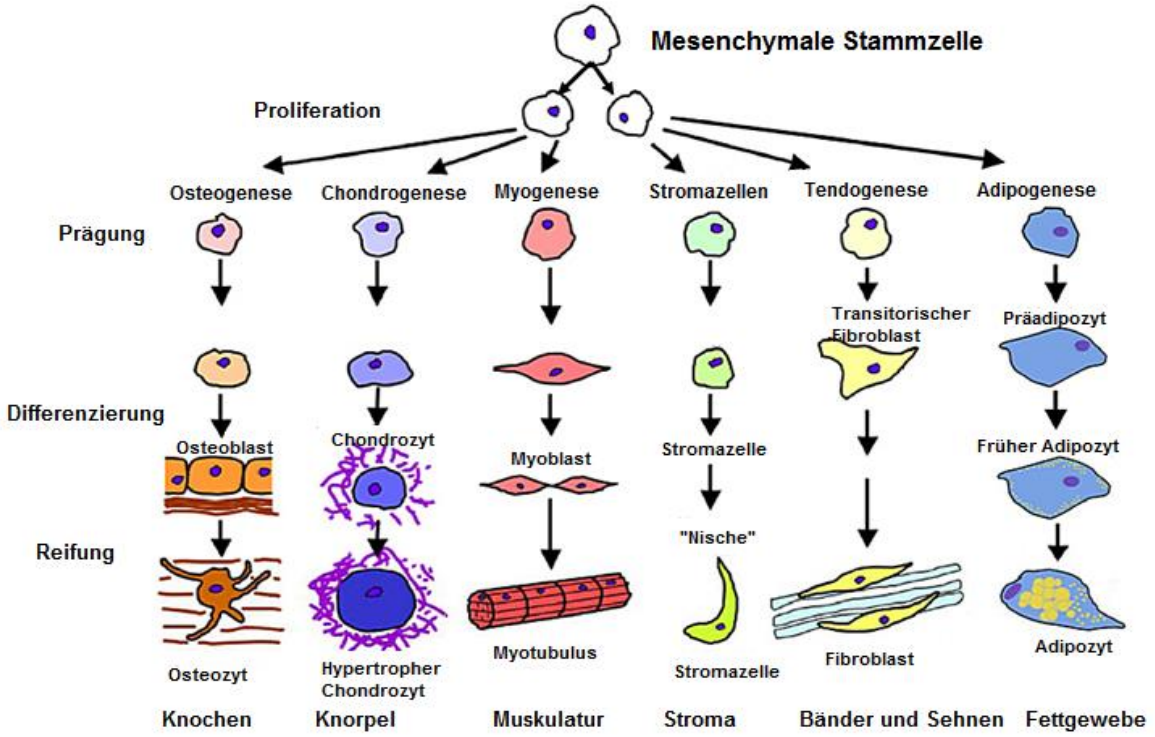


Abb. 3: Multipotentes Differenzierungspotenzial humaner mesenchymaler Stammzellen. Abhängig von den Kulturbedingungen, dem Wachstumsmedium und den Zusätzen differenzieren diese Zellen in-vitro in verschiedene Zellen mesenchymalen Gewebes. Teilausschnitte der Abbildung aus [10], Teile der Abbildung wurden übersetzt.

1.2.2.1 Differenzierungspotenzial

1.2.2.1.1 Adipogene Differenzierung

In-vitro Studien mit murinen Prä-Adipozyten Kulturen haben Teile der zellulären und molekularen Differenzierungsmechanismen aufgeklärt [32,33].

Voraussetzung zur Differenzierung von Prä-Adipozyten in Adipozyten ist ein Wachstumsstopp und ein Verlassen des normalen Zellzyklus gefolgt von einer klonalen Expansion der Zellen. Durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wird die Expression der für die adipogene Differenzierung notwendigen Gene gesteuert [1]. Wichtige externe Faktoren für die Aktivierung der Differenzierung sind Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Hierbei spielen Insulin, Glukokortikoide, IGF-1, Wachstumshormon, Prostaglandine sowie EGF, TGF-β und FGF eine Rolle. Durch Kinase-abhängige Signalübertragung erfolgt eine zeitlich definierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wobei die PPAR und die C/EBP Familien von führender Bedeutung sind. In-vitro kann eine adipogene Induktion durch Zugabe von IBMX, Dexamethason, Insulin und Indomethacin erreicht werden [31,33]. Die

Isoform PPAR-γ gilt hierbei als spezifischer Marker früher adipogener Differenzierung [33], während hingegen AP-2, das Adipozyte Protein 2, als Marker später adipogener Differenzierung verwendet wird [69].

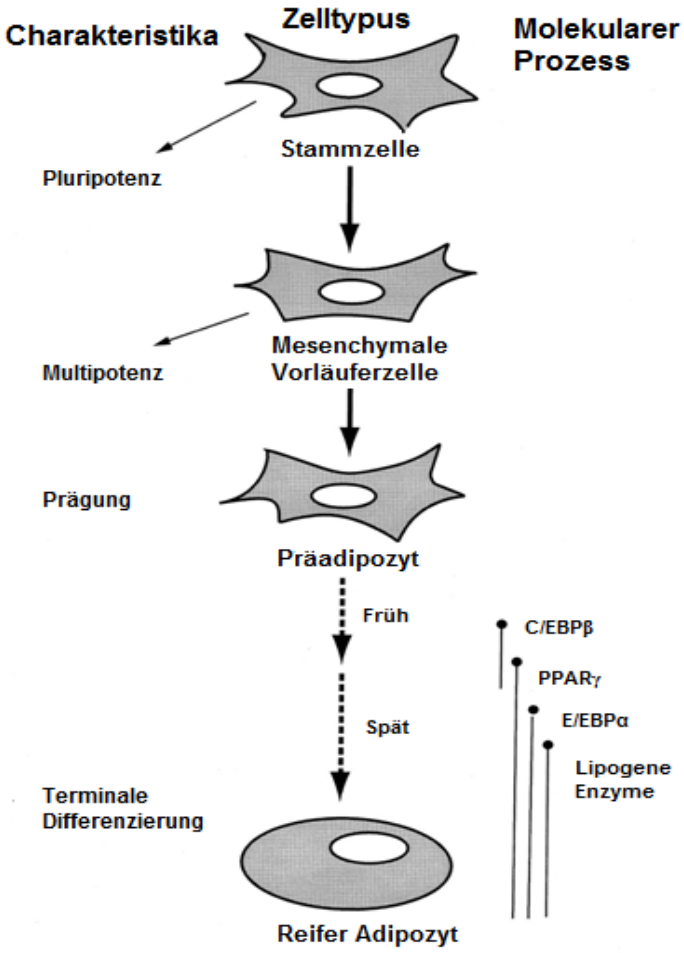


Abb. 4: Schematische Darstellung der adipogenen Differenzierung. Aus einer pluripotenten (embryonalen) Stammzelle entsteht durch entsprechende exogene Stimulation und Aktivierung verschiedener molekularer Signalwege, die auf der rechten Abbildungsseite dargestellt sind, ein terminal differenzierter Adipozyt. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Transkriptionsfaktoren PPAR und C/EBP. Ebenso sind morphologische Charakteristika abgebildet. PPAR= Peroxisome Proliferator-activated Receptor; C/EBP= CCAAT/Enhancer Binding Protein. Teilausschnitte der Abbildung aus [33], Teile der Abbildung wurden übersetzt.

1.2.2.1.2 Chondrogene Differenzierung

Hyaliner Knorpel besteht aus Chondrozyten und extrazellulärer Matrix. Die EZM besteht aus kollagenen Fasern vom Typ II. Diese sind eingebettet in ein Netz aus Proteoglykan-Aggregaten. Proteoglykane bestehen aus Glykosaminoglykanen, also aus langen Polysaccharidketten aus Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat, die an ein Trägerprotein gebunden sind und Glykoproteine genannt werden. Zahlreiche dieser Glykoproteine sind durch verschie-

dene Linkproteine an Hyaluronsäure gebunden und bilden so ein Proteoglykan [25]. Bekanntester Vertreter im Knorpelgewebe ist das Aggrekan.

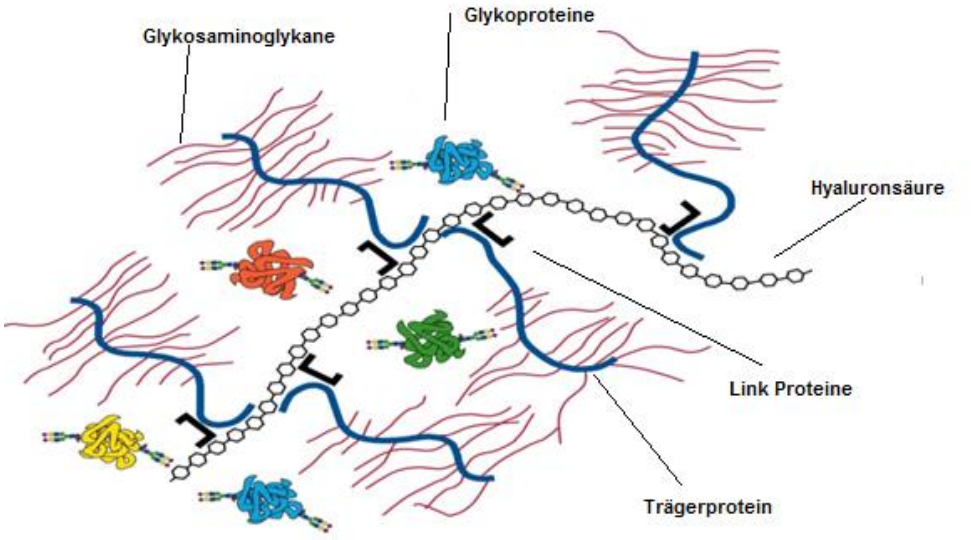


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Aggrekan-Komplexes. Etwa 150 Polysaccharidketten aus Glykosaminoglykanen sind an ein Trägerprotein gebunden und bilden ein Aggrekanmolekül. Zahlreiche dieser Glykoproteine sind über Linkproteine an Hyaluronsäure gebunden und über weitere Glykoproteine miteinander verknüpft. Abbildung aus [25], Beschriftung und Markierungen wurden hinzugefügt.

Die molekularen Mechanismen der chondrogenen Induktion sind noch nicht abschließend erforscht. Ein wichtiger Signalweg beinhaltet die durch Dexamethason vermittelte Aktivierung des SOX9 Transkriptionsfaktors, welcher die chondrogene Differenzierung unter anderem durch eine Aktivierung der Kollagensynthese induziert [74]. Darüber hinaus sind die Isoformen der TGF-β Familie von Bedeutung, welche die Synthese von Aggrekan und Kollagen aktivieren [4].

In-vitro wird eine chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Zugabe von Dexamethason, TGF-β und die Verbindung aus Insulin, Transferrin und Selenit sowie durch den positiven Einfluss zellulärer Kondensation in Pelletkultur gewährleistet [31].

1.2.2.1.3 Osteogene Differenzierung

Knochengewebe ist ein spezialisiertes Bindegewebe, welches aus Zellen und Interzellulärsubstanz (EZM) besteht. Aktive Osteoblasten sezernieren den organischen Anteil der Knochenmatrix, auch Osteoid genannt, bestehend aus Kollagen Typ I, Proteoglykanen und Glykoproteinen wie Osteopontin und Osteocalzin. Die Verkalkung des Osteoids wird durch das auf Osteoblasten befindliche Glykopro-

tein Osteopontin und das ebenfalls auf Osteoblasten lokalisierte Enzym Alkalische Phosphatase katalysiert. Während dieses Prozesses entstehen aus den Osteoblasten die inaktiven Osteozyten, die in Lakunen sitzen und über Fortsätze miteinander verbunden sind.

Die einzelnen Schritte des multifaktoriellen Prozesses der osteogenen Differenzierung aus MSC sind noch nicht bekannt. Die Wachstumsfaktoren der TGF-β Familie scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Vor allem BMP-2 und BMP-6 induzieren die osteogene Differenzierung [29,103] durch eine Aktivierung des MAP-Kinase Weges [37]. Anschließend kommt es zu einer verstärkten Aktivität des Transkriptionsfaktors Cbfa 1, welcher die Synthese von Alkalischer Phosphatase, Osteokalzin und Osteopontin verstärkt [80,97].

In-vitro wird die osteogene Differenzierung durch Zugabe von Dexamethason, 3-Glycero-Phosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat induziert [36]. Dexamethason bewirkt hierbei die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus der Gruppe der Leucin-Zipper und von Cbfa 1 [108].

1.2.2.2 Immunphänotyp

Humane MSC werden auch über die Expression typischer Oberflächenantigene charakterisiert.

Es ist mittlerweile offensichtlich, dass MSC aus unterschiedlichen Geweben in unterschiedlichen Ausmaß Oberflächenantigene exprimieren. Aufgrund dieser Unterschiede wurde von der International Society for Cellular Therapy eine Liste von Mindestanforderungen für die Definition von MSC erstellt, worin auch die Expression bestimmter Oberflächenantigene gefordert wird. Hierzu gehört die Expression von CD105, CD73 und CD90, des weiteren sollten hämatopoetische Marker wie CD45 und CD34 negativ sein [24]. CD29, CD44 und CD54 gelten als weitere positive Marker, CD106 wird von MSC nicht exprimiert [19,53,55,81,104].

Neuere Marker werden von hMSC je nach Ursprungsgewebe sehr unterschiedlich stark exprimiert. Hierzu zählen CD117 [38,51], CD271 [6,7,13,14,65], MSCA-1 [7,13,100] und Stro-1 [20,78].

1.2.3 Aktuelle Stammzelltherapien

Die Transplantation von HSC ist eine etablierte und oftmals die einzige kurative Therapieoption bei hämatologisch-onkologischen Erkrankungen, Immundefekten und angeborenen Erkrankungen wie Osteopetrose. Bei der akuten myeloischen Leukämie erfolgt durch die zytogenetische Analyse eine Risikostratifizierung, die eine optimale und individuell adaptierte Therapie ermöglicht. Die allogene oder autologe Stammzelltransplantation verbesserte in diesem Zusammenhang das Überleben der Patienten drastisch [22,23,72].

Adulte MSC sind bislang noch nicht in breiter klinischer Anwendung etabliert. Durch den einfachen Zugang zu den Zellen und deren potentes Wachstums- und Proliferationsverhalten bieten diese Zellen aber zahlreiche mögliche klinische Anwendungen. Vorteilhaft in der Anwendung ist, dass MSC keine immunogenen Epitope wie MHC I oder II exprimieren und so möglicherweise keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen [85]. Bereits erfolgte klinische Experimente bei der Regeneration verschiedener Organe, wie zum Beispiel nach Herzinfarkten, Querschnittstrauma oder Typ 1 Diabetes zeigen bislang unterschiedliche Ergebnisse [57,105].

1.3 Stammzelltherapie bei Speicheldrüsenschädigung

Die Xerostomie ist bislang weder prophylaktisch, kurativ noch symptomatisch ausreichend zu behandeln. Die Regeneration der Speicheldrüsenfunktion durch Stammzelltherapie stellt einen potenziell kurativen Ansatz dar.

Entscheidend ist die Isolation und Kultivierung von geeigneten Zellen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Verwendung von hMSC aus Speicheldrüsen, sogenannten SGSC.

1.3.1 Differenzierung in Azinuszellen

Die einzelnen Schritte und Mechanismen der Differenzierung von Vorläuferzellen in Azinuszellen sind noch nicht geklärt. Erste Untersuchungen wurden an immortalisierten Zelllinien aus Speicheldrüsen beschrieben. Nach Aufbereitung einzelner zellulärer Aggregate erfolgte eine Transfektion mit verschiedenen pSV Plasmiden,

um eine Immortalisierung der Zellen zu erreichen [63,64]. Diese Zellen entstammen nach elektronenmikroskopischer Analyse dem duktalen Kompartiment der Speicheldrüsen [76]. Unter Zugabe von Wachstumsfaktoren, darunter EGF, Dexamethason, Insulin, Transferrin, Selen, Ascorbinsäure sowie sekretagoger Substanzen konnte auf einem Basalmembranextrakt eine azinusähnliche Struktur über einen längeren Zeitraum kultiviert sowie eine Amylasesekretion detektiert werden [60].

Heute gilt die Verwendung einer dreidimensionalen Matrix als Voraussetzung für die Differenzierung in Azinuszellen. Häufig verwendet wird Matrigel. Matrigel ist ein Extrakt aus der Basalmembran von Tumoren. Basalmembranen spielen eine wichtige Rolle bei zellulärer Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferation. Einer der wichtigsten Bestandteile ist das Laminin-1, welches mit Integrinen der extrazellulären Matrix vernetzt ist [93,94], sowie verschiedene in der Matrix enthaltene Wachstumsfaktoren [102]. Jedoch gelten Laminin-1 und TGF-β3 als wichtigste Bestandteile des Matrigels, wenn es um die Differenzierung in Azinuszellen geht [35]. Auf diese Art konnten bereits Zellisolate nach enzymatischem Verdau aus humanem Gewebe in azinotubuläre Strukturen differenziert werden [86].

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten hSGSC isoliert und charakterisiert werden. Neben der Kultivierung und Passagierung, womit die klassischen Eigenschaften der Plastikadhärenz und Proliferation bewiesen werden sollten, sollten die Zellen in die mesenchymalen Grundgewebe Fett, Knochen und Knorpel differenziert werden, um das multipotente Verhalten der Zellen zu demonstrieren. Durch die FACS-Analyse der Oberflächenantigene nicht differenzierter Zellen sollten Ähnlichkeiten und Unterschiede zu den parallel kultivierten hBMSC identifiziert werden.

Anschließend wurde die Fähigkeit zur in-vitro Differenzierung in Azinuszellen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absauganlage	IBS Integra Biosciences
Analysewaage	Sartorius
Arbeitsbank, steril	HERA, Thermo Scientific
Brutschrank	HERA, Thermo Scientific
Dampfsterilisator	Thermo Scientific
Durchflusszytometer FACS Scan	BD Biosciences
Eismaschine AF-80	Scotsman
Wärmeschrank	Heraeus
Gefrierschränke	Liebherr
Kühlschranke	Liebherr
Mikrowelle	Moulinex
Mikroskop 1 CK30	Olympus
Mikroskop 2 AxioVision AX10	Zeiss
Mikrotom	PFM
MiniMACS Cell Separator	Milteny Biotec
Pipetten	Eppendorf Research Pro
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Schüttel-Gerät	VWR International
Schüttler Fast Prep 120	Bio 101 Savant

Stickstofftank	Euro-Cyl Chart
Tiefkühlschrank -80°	HERA, Thermo Scientific
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Tisch 5702R	Eppendorf

2.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Material	**Hersteller**
15 und 50ml Falcon Tubes	BD Biosciences
Culture Slides, 8 Kammern	BD Biosciences
Cryo Freezing Container	Nalgene
Cryo Tubes Vials	Nunc
Einmalpipetten, verschiedene Größen	Sarstedt
Eppendorf Gefäße, verschiedene Größen	Eppendorf
Deckgläser	Roth
Filterpapier Histo	Schreibpapier
FACS Röhrchen	BD Biosciences
Gewebekassette Histosette II	Simport
Hydrophober Stift	DAKO
Kanülen, verschiedene Größen	Braun
Large Cell Separation Columns	Milteny Biotec
Lysing Matrix Tubes D 1,4mm	MP Biomedicals
Neubauer - Zählkammer	VWR International
Objektträger, beschichtet	Thermo Scientific
Parafilm	Pechiney
Pinzetten, steril verpackt	Unomedical
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	ART
Plastikpetrischalen	Nunc

Serologische Pipetten, verschiedene Größen	VWR International
Qiashredder	Qiagen
Skalpell (Nr. 10, abgerundete Klinge)	B. Braun Aesculap
Spatel	VWR International
Spitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Spritzflaschen	Merck
Urinbecher	Nunc
Zellkulturflaschen mit Filterdeckel	BD Biosciences
Zellkulturplatten, verschiedene Größen	Nunc
Zellkulturschaber	BD Biosciences
Zellsieb, 70 und 100µm	BD Biosciences

2.1.3 Chemikalien

Reagenzien und Kits	**Hersteller**
Accutase	PAA
Aceton	Fluka
Alginat, 4%	Cell Med AG
Alzianblau	Roth
Anti-PE Micro Beads	Milteny Biotec
AutoMACS Rinsing Solution	Milteny Biotec
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin	Biochrome AG
Kalziumchlorid Lösung, 100mM (pH 7,6)	Roth
Cell Recovery Solution	BD Bioscience
CaliBRITE 3	BD Bioscience
Death Cell Discriminator	Milteny Biotec
Death Cell Discriminator Stop Reagenz	Milteny Biotec

Destilliertes Wasser	Fresenius
Dexamethason	Promokine
DMEM/HAM’s F12	Biochrome AG
DMSO 20%	Sigma-Aldrich
EDTA	Biochrome AG
EGF	R&D
EGTA	Sigma-Aldrich
Eisessig	Merck
Eosin G Stammlösung 5%	Roth
Essigsäure 0,5mol/l	Fluke
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich
FBS	PAA
FcR Blocking Reagenz, human	Milteny Biotec
FGF-2	R&D
Fixierlösung FACS	Milteny Biotec
Formalin, 3,7%, gepuffert	Fischer
Formalin, 37%	J.T. Baker
HCL 1M	AppliChem
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH
Hämatoxilin nach Gil II	Sigma-Aldrich
HistoGel	Thermo Scientific
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
Glyceringelatine	Merck
Insulin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
MACS BSA Stock Solution	Milteny Biotec

Matrigel, Growth Facducedtor Re	BD Biosciences
Methanol	Merck
Natriumchlorid Lösung, 0,9%	Fresenius
Natrium Lauge, 1N	Merck
Oil Red O	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS (w/o Ca^{2+}, Mg^{2+}), Dulbecco	PAA
PBS, 10x konzentriert	PAA
Penizillin	Biochrom
Perjodsäure	Roth
Pronase	Calbiochem
Rattenschwanz Kollagen Typ I, 3,92mg/ml	BD Biosciences
RLT Lysis Puffer	Qiagen
Histokitt	Roth
SCHIFF Reagenz	Roth
Schweine Serum	BD Biosciences
Stickstoff Supplement 1/100	Invitrogen
Streptomycin	Biochrom
TBS Pulver	DAKO
TRIS	DAKO
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	BIOCHROM
Trypanblau Stammlösung 0,4%	Sigma-Aldrich
Twenn 20	Sigma-Aldrich
X-VIVO (FACS)	Milteny Biotec
Xylol	VWR International

2.1.4 Arbeitslösungen

Alzianblau Färbelösung	Alzianblau 1% (w/v) in Essigsäure 3% (v/v), pH 2,5
Antikörperverdünnung	1% BSA in 0,05M Tris-HCL
EGTA Puffer	2 mM EGTA in PBS, autoklaviert
Eosin Färbelösung	Eosin 0,5% in A.dest
FACS Färbepuffer	PBS mit 2% hitzeinaktiviertes FCS (30min bei 56 °) und 0,09% (w/v) 5%-iges Natrium Azid; pH 7,2 – 7,6
Hyaluronidase Lösung	0,1g Hyaluronidase in 10ml PBS
MACS Puffer	MACS BSA Stock Sulution 1:20 verdünnt in Auto-MACS Rinsing Solution
Oil Red O Färbelösung	Stammlösung: 300mg Oil Red O in 100ml 99% Isopropanol. Färbelösung: 3ml Stammlösung in 2ml A. dest. gefiltert
Pronase Lösung	0,02g Pronase in 10ml PBS
Schweine Serum Gebrauchslösung 20%	20% Schweine Serum in Tris-HCL
TBST Puffer	1 Beutel TBS in 1l A.dest. + 1ml Twenn
TRIS Puffer	1ml TRIS-HCl 0,05M + 9ml A.dest.
Trypanblau Färbelösung	1ml Trypanblau Stammlösung 0,4% in 10ml PBS

2.1.5 Färbe Kits

Immunhistochemie: LSAB Plus HRP Kit: Dako (Cat.: K0679)

Peroxidase Block (Gebrauchslösung)

Avidin Block (Gebrauchslösung)

Biotin Block (Gebrauchslösung)

Biotin-gebundener Link Antikörper (Gebrauchslösung)

Streptavidin-Peroxidase (Gebrauchslösung)

DAB Chromogen Substrat (1 Tropfen in 1ml A.dest.)

Alkalische Phosphatase Kit: Sigma-Aldrich (Cat.: 86R-1KT)

Fixierung: 2,5ml Zitrat + 6,5ml Aceton + 0,8ml 37%-iges Formalin

Färbelösung: 0,1ml Natrium Nitrit + 0,1ml FRV Alkalilösung. Nach 2 Minuten Zugabe von 4,5ml A.dest. + 0,1ml AS-BI Lösung, lichtgeschützt.

2.1.6 Medien und Zusätze

Standardkulturmedium hSGSC und hBMSC

DMEM/Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Ham's Nutrient Mixture F12), Biochrom AG, pH 7,2, mit stabilem Glutamin, niedriger Endotoxingehalt

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin (10000E/10mg pro ml)

Differenzierungsmedien

Adipogenes Differenzierungsmedium, NH AdipoDiff Medium, Milteny Biotec, 1% P/S (10000E/10mg pro ml)

Osteogenes Differenzierungsmedium, NH OsteoDiff Medium, Milteny Biotec, 1% P/S (10000E/10mg pro ml)

Chondrogenes Differenzierungsmedium, NH ChondroDiff Medium, Milteny Biotec, 1% P/S (10000E/10mg pro ml)

Azinusdifferenzierungsmedium

DMEM/Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Ham's Nutrient Mixture F12), 1% P/S (10000E/10mg pro ml)

EGF 20ng/ml

FGF-2 20ng/ml

Dexamethason 1µM

Insulin 10µg/ml

N_2 Supplement 1/100

Azinuskontrollmedium

DMEM/Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Ham's Nutrient Mixture F12), 1% P/S (10000E/10mg pro ml)

2.1.7 Antikörper

Tab. 1: Primäre und Sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie. CD= Cluster of differentiation; FITC= Fluoresceinisotiocyanat; Ig= Immunglobulin; MSCA-1= Mesenchymal Stem Cell Antigen 1; PE= Phycoerythrin

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Konzentration Verdünnung	Hersteller Bestellnummer
CD29	IgG1, Maus	PE	1:5	BD 555443
CD34	IgG1, Maus	PE	1:5	BD 555822
CD44	IgG1, Maus	PE	1:6	BD 550989
CD45	IgG1, Maus	FITC	1:6	BD 555482
CD54	IgG1, Maus	PE	1:6	BD 555511
CD73	IgG1, Maus	PE	1:6	BD 550257
CD90	IgG1, Maus	FITC	1:6	BD 555595
CD105	IgG1, Maus	PE	1:6	R&D FAB 10971P
CD106	IgG1, Maus	PE	1:6	BioLegend 305806
CD117	IgG1, Maus	PE	1:6	BD 555714
CD271	IgG1, Maus	PE	1:6	BD 557196
MSCA-1	IgG1, Maus	PE	1:12	Milteny 130093587
Stro-1	IgM, Maus	FITC	1:12	SanC.sc-47733
Isotype	IgG1, Maus	PE	1:6	BD 555749
Isotype	IgG1, Maus	FITC	1:6	BD 555748
Isotype	IgM, Maus	FITC	1:12	SanC.sc-2859

Tab. 2: Antikörper für die Immunhistochemie. AP-2= Adipocyte Protein 2; Ig= Immunglobulin

Antigen	Isotyp, Wirt	Konzentration Verdünnung	Hersteller Bestellnummer
α-Amylase	IgGα2, Maus	1:166	Abcam AB54765
Vimentin	IgGα2, Maus	1:1000	Serotec OBT3104
Kallikrein 13	IgG, Kaninchen	1:240	Lifespan LS-B524
Kollagen Typ I	IgG, Kaninchen	1:100	Serotec 2150-0020
Kollagen Typ II	IgG1, Maus	1:4000	Developmental Studies Hybridoma Bank II-II6B3
Aggrekan	IgG1, Maus	1:100	Serotec MCA4722
Osteopontin	IgG1, Maus	1:100	Vector Lab VP-0852
AP-2	IgG1, Maus	1:500	Serotec MCA3500Z
Isotype Kontrolle	IgG1, Maus	angepasst	DAKO X0931
Isotype Kontrolle	IgG, Kaninchen	angepasst	DAKO X0936
Isotype Kontrolle	IgGα2, Maus	angepasst	DAKO X0943

2.1.8 Gewebe für Zellkultur und Patientendaten

Alle in dieser Arbeit verwendeten hSGSC stammen aus OP-Speicheldrüsenpräparaten der HNO-Klinik Ulm und wurden mit nachfolgend dargestelltem Protokoll isoliert und kultiviert. Die Zustimmung der Ethikkommission lag vor (Antragsnummer Ethikkommision:165/08).

Die anamnestischen Daten sowie die Patientendaten stammen aus der digitalen Patientendokumentation der HNO Universitätsklinik Ulm. Erfasst wurde neben Alter, Operationszeitpunkt, Operation und Diagnose auch das Risikoverhalten der Patienten. Hierbei wurde vom aufnehmenden Arzt nach regelmäßiger Medikamenteneinnahme (Anzahl der Medikamente), Nikotinkonsum (Ja/Nein, Anzahl der Zigaretten pro Tag) und Alkoholkonsum (nie, gelegentlich, selten, täglich) gefragt. In der Auswertung der Daten wurde zwischen „kein Medikamentenkonsum“ und „ein oder mehreren Medikamenten“ unterschieden, zwischen „kein Alkoholkonsum“

(nie) und „gelegentlich bis täglich“ sowie zwischen „kein Nikotinkonsum“ und „Nikotinkonsum“.

Ein Teil der Experimente wurde vergleichend mit hBMSC durchgeführt. Die Zellen wurden aus Knochenmark-Aspiraten der Firma LONZA (USA) isoliert und kultiviert. Nach Herstellerangaben handelte es sich um Präparate von gesunden Spendern.

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden. Es wurden ausschließlich steril verpackte Einmalartikel oder bei 121°C über 15 Minuten autoklavierte Materialien und Lösungen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von hSGSC

Die Gewinnung der MSC aus humanen Speicheldrüsenpräparaten erfolgte in der HNO-Universitätsklinik Ulm. Die Patienten wurden durch ärztliches Personal der HNO-Klinik Ulm über die Gewinnung von Speicheldrüsengewebe im Rahmen des medizinisch indizierten Eingriffes im Kopf-Hals Bereich aufgeklärt. Nach Zustimmung der Patienten wurden circa zwei mal zwei Zentimeter große Stücke gesunden Speicheldrüsengewebes auf Eis ins HNO-Labor transportiert.

Das Gewebe wurde zuerst in einem 50ml Tube zweimal in EGTA Puffer gespült. Daraufhin erfolgte die mechanische Zerkleinerung mittels Skalpell und eines 100µl Siebes in einer Petrischale. Das Gewebe wurde mit einem Spritzenstempel durch ein Sieb gedrückt, bis nur noch bindegewebige Fasern im Sieb zurückblieben. Nach zweimaliger Zentrifugation des gesamten Materials in EGTA und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml Accutase resuspendiert und durch die darin enthaltenen proteo- und kollagenolytischen Enzyme verdaut.

Dieser Prozess fand über 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95%-iger relativer Luftfeuchtigkeit statt.

Daraufhin erfolgte eine Separation der Zellsuspension über ein 70µm Sieb, wobei der Überstand verworfen wurde. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Nach Zentrifugation über 5 Minuten bei Raumtempe-

ratur erfolgte die Zählung der Zellen mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer und anschließend die Aussaat aller primären Zellen in einer 10cm^2 Kulturflasche. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach drei Tagen. Dabei wurden nicht adhärente Zellen, wie zum Beispiel Blutzellen, mit dem Medium abgesaugt, adhärente Zellen wurden weiter kultiviert.

2.2.2 Kultivierung und Expansion von hSGSC

Das Wachstum der hSGSC erfolgte als Monolayer Zellkultur bei standardisierten Bedingungen im Brutschrank. Als Kulturmedium diente das Standardkulturmedium DMEM/Ham´s F12 Medium mit 10% FBS und 1% P/S zur Prophylaxe einer bakteriellen Kontamination. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche.

Bei mikroskopisch 80 – 90%-iger Konfluenz wurden die Zellen in PBS gespült, mit Trypsinlösung über 10 bis 15 Minuten im Brutschrank inkubiert und hierdurch gelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Die Zellzählung erfolgte mittels Trypanblau Färbung in einer Neubauer Zählkammer. Trypanblau färbt tote Zellen blau an, lebende Zellen erscheinen farblos. Hierdurch wurde die Gesamtzellzahl sowie die Zellzahl pro cm^2 bestimmt.

Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Zelldichte von 2,5x10^3 Zellen pro cm^2 in Zellkulturflaschen.

2.2.3 Kryokonservierung von hSGSC

Wenn ausreichend Zellen zur Verfügung standen, wurde ein Teil der hSGSC kryokonserviert. Hierdurch konnte auch zu späteren Zeitpunkten bei neuen Fragestellungen und Methoden auf die Zellen zurückgegriffen werden. Die Zellen wurden hierfür trypsiniert und gezählt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die als Pellet vorliegenden Zellen in auf Eis lagerndes Kulturmedium in 40% FCS resuspendiert. Pro Kryotube wurden maximal 10^7 Zellen in 500µl Medium pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens an eisgekühltem Medium mit 20% DMSO. Die Zellen wurden in einer vorgekühlten Isoseptolbox bei minus 80°C über Nacht tiefgefroren, wobei das Isoseptol eine langsame und kontinuierliche Abkühlung ermöglichte. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4 Immunphänotypische Charakterisierung von hSGSC mittels FACS

Die hSGSC wurden auf die Expression bestimmter Oberflächenantigene hin untersucht. Hierfür erfolgte eine Durchflusszytometrie in den Passagen drei, sechs, neun und zwölf.

Die Zellen wurden trypsiniert, die enzymatische Reaktion mit X-VIVO Kulturmedium gestoppt und die einzelnen Zellen in FCS Färbepuffer in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Ab hier erfolgten alle Arbeiten auf Eis. Nach Filtern über einem 100µm Zellsieb und Zentrifugation wurden pro well maximal $1x10^6$ Zellen in 35µl Endvolumen FCS Färbepuffer in einer 96 well Platte verteilt. Anschließend wurden 15µl FcR Blocking Reagenz und 1µl Death Cell Discriminator zugegeben und unter einer Lampe auf Eis inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper, 5 – 10µl je nach Antikörper, zugefügt, anschließend erfolgte eine erneute Inkubation über 30min im Kühlschrank. Anschließend erfolgten Waschschritte mit FCS Färbepuffer und die Resuspension in 100µl FCS Färbepuffer mit 66µl Fixierlösung und 5µl Death Cell Discriminator Stop Reagenz. Die Zellen wurden in FACS Röhrchen überführt und zu einem Endvolumen von 500µl mit FCS Färbepuffer aufgefüllt.

Das Durchflusszytometer wurde mit Calibrite Beads, Negativkontrollen, Isotypen und Antikörpern kalibriert und kompensiert.

Bereits durch die Interaktion der einzelnen Zelle mit dem einfallenden Lichtstrahl kann, auch ohne die Wellenlänge zu bestimmen, die Lichtstreuung gemessen werden. Der Parameter Vorwärtsstreulicht, FSC, ist ein Maß für die Zellgröße. Je größer die Zelle, desto größer die Vorwärtsstreuung des Lichts. Die Seitwärtsstreuung, SSC, ist ein Maß für die Granularität der Zellen. In einem Dot-Blot Diagramm kann die gewünschte Zielpopulation manuell von Zelltrümmern und Verunreinigungen abgegrenzt werden. In allen weiteren Analysen wurden nur Zellen aus der Zielpopulation berücksichtigt. MSC sind im Allgemeinen große und granulierte Zellen.

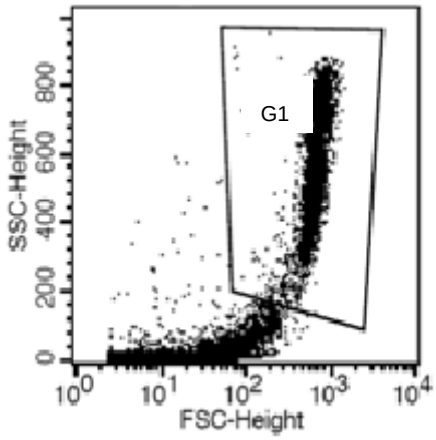


Abb. 6: Dot-Blot Darstellung einer hSGSC Kultur. FSC ist auf der Abszisse und SSC auf der Ordinate dargestellt. Für alle weiteren Untersuchungen wurde die Zielpopulation gegatet (G1). FSC= Forward Light Scatter; G= Gate; hSGSC= human Salivary Gland Stem Cells; SSC =Sideward Light Scatter.

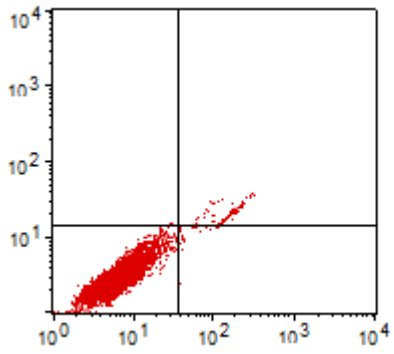
Die Messung der Fluoreszenz bietet die Möglichkeit einer genaueren Charakterisierung der Zellpopulation. Das Prinzip basiert auf der Inkubation einzelner Zellen mit einem spezifischen, primären Antikörper. Nach Bindung eines sekundären, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpers entsendet jede mit einem sekundären Antikörper besetzte Zelle nach Anregung mit einem Argon-Laserstrahl Licht in einer definierten Wellenlänge. Die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden sich in ihrem Emissionsspektrum. Verwendet wurden der Farbstoff FITC mit einer Wellenlänge von 530 nm und PE mit einer Wellenlänge von 575 nm. Durch den Vorgang der elektrischen Kompensation wird einer Überlappung der Wellenlängen durch Subtraktion entgegen gewirkt.

2.2.5 Grundlagen der FACS Datenauswertung und Statistik

Die Darstellung der Fluoreszenzstärke einer Antikörper-markierten Zelle erfolgt wahlweise in einem Dot-Blot oder in einem Histogramm.

In einem Dot-Blot können die Populationen positiver Zellen von den negativen Zellen abgegrenzt werden. Auf der Abszisse ist das Antigen, auf der Ordinate die Größe der Zellen aufgetragen. Die Betrachtung der Isotypenkontrolle ist zur Kontrolle der Eigenfluoreszenz wichtig. In einer Quadrantenstatistik kann der Prozentteil positiver Zellen dargestellt werden. Nachfolgend ist eine Ermittlung des statistischen Mittelwerts mit einem t-Test möglich. Hierfür erfolgte primär die Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung. Durch Dividieren der Standardabweichung durch die Wurzel der Anzahl der Ereignisse (n)

erhält man den Studentfaktor. Das Vertrauensintervall der t-Verteilung TINV (Wahrscheinlichkeit 0,05; Freiheitsgrad n-1) multipliziert mit dem Studentfaktor ergibt Delta X, ein Maß für die Abweichung im t-Test. Alle im Ergebnisteil angegeben Durchschnittwerte der Dot-Blot Analysen basieren auf dieser Methode.



Quadrant Statistics

Gate: G1

Gated Events: 7599 Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Tota
UL	4	0.05	0.04
UR	75	0.99	0.75
LL	7464	98.22	74.64
LR	56	0.74	0.56

Abb. 7: Dot-Blot Darstellung eines Antigens nach Durchflusszytometrie. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzstärke des Antigens abgebildet, auf der Ordinate die Größe der Zellen. Mithilfe einer Vier-Quadranten Statistik kann der positive Anteil an Zellen ermittelt werden, insbesondere in Kenntnis der Dot-Blot Darstellung einer Isotypenkontrolle. Im aufgeführten Beispiel waren 0,99% der Zellen positiv zu werten. G1= Gate1; LL= Lower Left; LR= Lower Right; UL= Upper Left; UR= Upper Right.

In einem Histo-Blot kann die Expression des gewünschten Antigens direkt mit der Isotypenkontrolle verglichen werden. Dabei werden auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität und auf der Ordinate die relative Häufigkeit des Ereignisses dargestellt. Als Schwellenwert wird die höchste Intensität der Isotypenkontrolle bezeichnet. Gefärbte Zellen mit höherer Intensität exprimieren das Antigen. Der Anteil positiver Zellen kann ebenfalls angegeben werden.

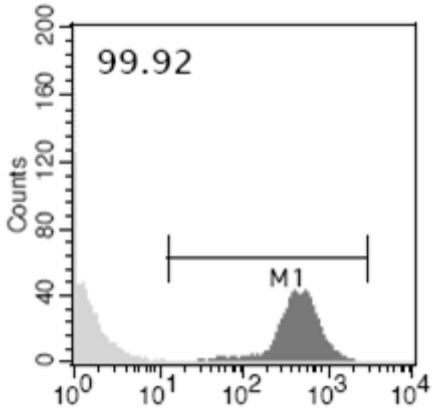
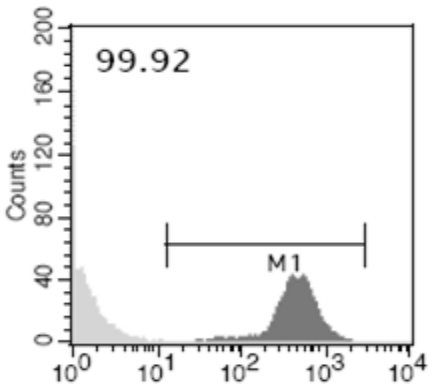


Abb. 8: Histo-Blot Darstellung eine hSGSC nach Durchflusszytometrie. Auf der Abszisse wird die Fluoreszenzintensität, auf der Ordinate die Häufigkeit des Ereignisses dargestellt. Alle Zellen mit einer höheren Intensität als die Isotype exprimieren das Antigen und sind im Bereich M1 prozentual dargestellt.

In weniger klaren Fällen ist diese Methode der Auswertung ungenau, da die Veränderung einzelner Zellen nicht berücksichtigt wird und somit schwache Veränderungen in der Expression nicht sicher erfasst werden.

Um zu entscheiden, ob ein Antigen exprimiert wird, ist nicht nur die absolute Fluoreszenzstärke maßgeblich. Ein Shift einer negativen Zelle mit geringer Eigenfluoreszenz, deren absolute Fluoreszenzstärke unterhalb des Schwellenwertes der Isotype liegt, wird nicht erfasst, obwohl sie das Antigen exprimiert. Daher haben wir hier die Mediane der Fluoreszenzintensität von Antigen und Isotype berechnet und als Delta Median, das bedeutet als durchschnittliche Differenz des Median zwischen Antigen und Isotype dargestellt. Nach Analyse mehrerer Kulturen lässt sich durch die Berechnung des Delta Median ein zuverlässiges Maß der Expressionsstärke angeben.



Histogram Statistics

Gate: G1 Gated Events: 4962
Total Events: 10000 X Parameter: CD

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
All	4972	100.00	49.72	414.18
M1	4968	99.92	49.68	414.18

Abb. 9: Histo-Blot Darstellung und Statistik einer hSGSC Kultur nach Durchflusszytometrie. Mit der dargestellten Statistik lässt sich neben der bereits oben verwendeten Methode (M1=positive Zellen) auch der Median anzeigen. Die Durchschnittwerte des Median können mit dem t-Test errechnet werden. G1= Gate 1; CD= Cluster of Differentiation.

2.2.6 Zellseparation durch MACS

Mit der MACS Methode können spezifische Antigene ausgewählt werden und Zellen auf Grund der Expression dieses Antigens von den übrigen Zellen getrennt werden. Hierfür erfolgt die Markierung des Antigens mit einem spezifischen Antikörper. Dieser Antikörper wird sekundär mit magnetischen Beads markiert. Beim Durchlaufen einer Magnetsäule bleiben markierte Zellen in der Säule zurück und können anschließend separat kultiviert werden.

Hierfür wurden die Zellen nach Trypsinierung und Zentrifugation als Pellet in 100µl MACS Puffer gelöst. Anschließend erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis. Zugabe von 10µl Anti-MSCA-1 PE Maus Antikörper (siehe Tabelle 1) für maximal 10^7 Zellen und Inkubation für 10 Minuten bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Zugabe von

5ml MACS Puffer. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 80µl MACS Puffer gelöst, 20µl Anti-PE MicroBeads hinzugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5ml MACS Puffer, Filtration über ein 70µm Zellsieb und eine erneute Zentrifugation. Die Zellen wurden dann in 500µl MACS Puffer aufgenommen. Die Large Cell Separation Column wurde in den MiniMACS Cell Separator gestellt und mit 500µl MACS Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig auf die Säule pipettiert. Die unmarkierten Zellen laufen durch und wurden am Ende der Säule aufgefangen. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit 500µl MACS Puffer wurde die Säule aus dem Gestell entfernt und somit das Magnetfeld aufgehoben. Mit Hilfe eines Stempels werden 1ml MACS Puffer durch die Säule gedrückt, hierbei lösen sich die markierten Zellen und können am Ende der Säule aufgefangen werden. Nach anschließender Zellzählung kann die Kultivierung der positiven und negativen Zellen separat erfolgen.

2.2.7 Differenzierungssysteme

2.2.7.1 Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung in Fettzellen erfolgte als Monolayer-Zellkultursystem in 8 well Culture Slides für die histologische und immunhistochemische Charakterisierung und in 25cm^2 Zellkulturflaschen für die Gewinnung der Zelllysate zur anschließenden Genexpressionsanalyse. Die Zellen wurden dabei in einer Dichte von 5,0x10^3 Zellen/cm^2 zwischen Passage drei und fünf ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in einem adipogenem Differenzierungsmedium, supplementiert mit Indometacin, IBMX, Insulin und Dexamethason. Die Kontrolle erfolgte in Standardkulturmedium, ein Mediumwechsel wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Nach sieben, 14 und 21 Tagen erfolgte die Evaluierung des Differenzierungspotenzials der induzierten Zellen.

Histologisch wurden die Fettvakuolen der Adipozyten mittels Oil Red O Färbung nachgewiesen. Hierbei werden neutrale Triglyceride und Lipide in den Fettvakuolen leuchtend rot angefärbt (siehe 2.2.9.4). Immunhistochemisch wurde in dieser Arbeit das Adipocyte Protein 2, auch Fatty-Acid binding Protein 4 genannt, nachgewiesen (siehe 2.2.10).

2.2.7.2 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung erfolgte in 8 well Culture Slides und 25cm^2 Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5,0x10^3 Zellen/cm^2 ausgesät. Das Differenzierungsmedium enthielt Ascorbinsäure 2-Phosphat, 3-Glycerophosphat und Dexamethason, die Kontrolle erfolgte in Standardkulturmedium. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Der Nachweis der stattgefundenen Differenzierung gelang mittels Alkalischer Phophatase Färbung (siehe 2.2.9.5) und Antikörpern gegen Osteopontin (2.2.10).

2.2.7.3 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurde eine dreidimensionale Pelletkultur verwendet. Hierfür wurden 2,5x10^5 Zellen in einem 10ml Röhrchen abzentrifugiert und für drei Tage in Differenzierungs- bzw. Kontrollmedium im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer in 24 well Platten und ein Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage. Nach sieben, 14 und 21 Tagen erfolgte die Auswertung der Differenzierung. Hierfür wurden die Pellets mit einer Pipettenspitze angesaugt und in eine mit Filterpapier ausgelegte Gewebekassette überführt. Flüssiges HistoGel, in welches das Pellet eingebettet wurde, verhinderte die Zerstörung des Pellets während der Formalin Fixierung und erleichterte das nachfolgende Einbetten in Paraffin und das Schneiden. Histologisch wurden Bestandteile der EZM mit der HE-, Alzianblau- und Alzianblau–PAS-Färbung nachgewiesen (siehe 2.2.9.1, 2.2.9.2 und 2.2.9.3). Immunhistochemisch wurden Aggrekan und die Kollagene Typ I und Typ II als Bestandteile der EZM nachgewiesen (siehe 2.2.10). Die Kultivierung der Pellets für die Genexpressionsanalyse erfolgte in gleicher Art und Weise.

2.2.8 Differenzierung in Azinuszellen

Die Differenzierung in Azinuszellen erfolgte in einem dreidimensionalen Zellkultursystem. Es wurden Matrices aus Alginat, Kollagen und Matrigel getestet, um die idealen Bedingungen für eine Differenzierung festzustellen.

Die Versuche wurden in 24 well Zellkulturplatten durchgeführt. Ein well hatte eine Fläche von 1,54cm^2. Es wurden verschiedene Volumina zwischen 100 und 400µl der Matrix getestet, um die ideale Höhe der Matrix in Bezug auf Zellmigration und Nährstoffversorgung zu testen. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wurden pro well 400µl Medium verwendet. Die Zellzahl variierte je nach Versuchsaufbau zwischen 10^4 und 10^5 Zellen pro well. Die ideale Konzentration der einzelnen Matrices wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet.

Für die Induktion wurde DMEM/Hams´s F12 mit EGF, FGF, Insulin, Dexamethason und N_2 Supplement ergänzt. Die Kontrolle erfolgte in DMEM/Hams´s F12 Kulturmedium.

2.2.8.1 Alginat Matrix

Alginat wurde in einer Stammkonzentration von 4% verwendet. In den Versuchen wurden verschiedene Applikationsformen mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 4% und 0,66% getestet. Die Verdünnung des Alginat erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung zur gewünschten Endkonzentration. Bei der Verwendung von Alginat als dreidimensionale Matrix wurden 100 - 400µl des auf Raumtemperatur mit physiologischer Kochsalzlösung vermischten Alginat in 24 well Platten pipettiert. Durch vorsichtige, tropfenweise Zugabe von 100mM $CaCl_2$ Lösung (pH 7,6) verfestigte sich das Gel, ohne seine runde Form mit einer Höhe von 1,5mm zu verlieren. Nach Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Abnahme der $CaCl_2$ Lösung und mehrfaches Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung. Anschließend wurden 10^4 bis 10^5 der zuvor trypsinierten Zellen in 400µl Kontroll- bzw. Differenzierungsmedium hinzugegeben.

Bei der Verwendung von Alginat in Tropfenform wurden die Zellen vor dem Gelationsprozess in das noch flüssige Alginat eingebracht. Hierfür erfolgte die Verdünnung des Alginat mit in physiologischer Kochsalzlösung suspendierten Zellen zu einer Alginatkonzentration von 1,3%. Anschließend wurde die Mischung vorsichtig durch eine 26G Nadel langsam in 100mM $CaCl_2$ Lösung (pH 7,6) eingetropft. Mit

einem Rührmagnet wurden die Beads für 30 Minuten in der $CaCl_2$ Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Beads vorsichtig entnommen und mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, danach erfolgte die Inkubation in 400µl Kontroll- bzw. Differenzierungsmedium, wobei bis zu 20 Beads in einem well einer 24 well Platte kultiviert wurden.

2.2.8.2 Kollagen Matrix

Für die Verwendung von Kollagen Typ I als Matrix wurde Rattenschwanzkollagen Typ I mit einer Konzentration der Stammlösung von 3,92mg/ml verwendet. In den durchgeführten Experimenten wurden Konzentrationen des Kollagens zwischen 1,5 und 3,5mg/ml verwendet. Gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers wurde das Kollagen auf Eis mit einer spezifischen Menge 10-fach konzentrierter PBS Lösung, 1N NaOH Lösung und sterilem destillierten Wasser verdünnt. Nach Aufbringen von 100 - 400µl Kollagenlösung pro well erfolgte die Gelierung durch Inkubation im Brutschrank für eine halbe Stunde. Anschließend konnten 10^4 bis 10^5 zuvor trypsinierte Zellen in 400µl Kontroll- bzw. Differenzierungsmedium aufgebracht werden.

2.2.8.3 Matrigel Matrix

Matrigel wurde in einer Konzentration von 7,5mg/ml verwendet. Nach Auftauen des Matrigels bei 4°C über zwölf Stunden wurden 24 well Platten mit 100 – 400µl pro well beschichtet. Die Arbeiten erfolgten auf Eis, um einer frühzeitigen Gelierung des Matrigels vorzubeugen. Auf blasenfreies Pipettieren und gleichmäßige Verteilung des Matrigels wurde geachtet. Anschließend wurden die beschichteten Platten für 30 Minuten in den Brutschrank gestellt. In dieser Zeit verfestigte sich das Matrigel zu einer Gelphase. Die Zellen wurden in Induktions- und Kontrollgruppe geteilt und im entsprechenden Medium resuspendiert. Pro well wurden die Zellen in 400µl Medium ausgesät. Es wurden 10^4 und 10^5 Zellen pro well verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei das Medium aus jedem well einzeln und vorsichtig mit einer dünnen Pipette abgezogen wurde, um die Matrigel-Kulturen nicht zu beeinträchtigen.

2.2.8.4 Matrigel-Kollagen Matrix

Des Weiteren wurden Versuche mit Mischungen aus Matrigel und Kollagen Typ I durchgeführt. Hierbei wurde nach der Herstellung des Kollagen Typ I in Konzentrationen zwischen 1,5 und 3,5mg/ml Matrigel in einer Konzentration von 7,5mg/ml hinzugefügt. Das Volumen der Matrix betrug 100 – 400µl. Der Anteil von Matrigel betrug 20 – 80%, der Anteil von Kollagen Typ I entsprechend 80 – 20% am Gesamtvolumen der Matrix. Es wurden 10^4 bis 10^5 Zellen in 400µl Differenzierungs- bzw. Kontrollmedium verwendet.

2.2.8.5 Detektion der Differenzierung in Azinuszellen

Die mikroskopische Analyse der nativen, ungefärbten Zellen erfolgte während der bis zu 28-tägigen Bebrütungsdauer unter dem Phasenkontrastmikroskop.

Eine Gewinnung des histologischen und immunhistochemischen Probenmaterials erfolgte bei hoher Zellzahl mit 10^5 Zellen pro well, wobei die Bildung makroskopisch sichtbarer Aggregate abgewartet wurde. Diese konnten bereits nach sieben Tagen nach Abnahme des Mediums mit der Pipettenspitze angesaugt und in HistoGel aufgenommen werden. Die Fixierung erfolgte in Formalin mit anschließender Einbettung in Paraffin.

Die histologische Charakterisierung erfolgte mit den Standardfärbungen HE, PAS und Alzianblau (siehe 2.2.9.1, 2.2.9.2 und 2.2.9.3). Immunhistochemisch wurden die Primärantikörper gegen α-Amylase, Kallikrein 13 und Vimentin verwendet (siehe 2.2.10).

Die Kultivierung der Zellen für die Genexpressionsanalyse erfolgte in reinem Matrigel mit Zellzahlen zwischen 10^4 und 10^5 Zellen pro well.

2.2.9 Histologische Methoden

Es wurden zwei Prozeduren zur Gewinnung des Zellmaterials verwendet.

Zum Einen wurden große, dreidimensionale Strukturen wie Teile der Speicheldrüsen direkt in Formalin über 24 Stunden fixiert. Kleinere Strukturen, also chondrogene Pellets und Azinuszell-Aggregate, wurden in HistoGel aufgenommen, um den Erhalt der Gewebestruktur und das Wiederauffinden der Proben zu gewährleisten, und in mit Filterpapier ausgekleideten Gewebekassetten fixiert. Anschließend erfolgte die automatisierte Dehydrierung und Fixierung über zwölf Stunden.

Die Schnitte wurden in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden am Mikrotom in 5µm dicke Schnitte erfolgte die Trocknung über mindestens 24 Stunden und die Hitzefixierung über eine Stunde bei 60°C. Über eine absteigende Alkoholreihe (3x5 Minuten Xylol, 2x3 Minuten 100%Isopropanol, je 3 Minuten 90%, 75% und 50% Isopropanol) wurden die Schnitte rehydriert, entparaffiniert und anschließend gefärbt (siehe 2.2.9.1, 2.2.9.2. und 2.2.9.3). Am Ende der Färbung erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol sowie die Versiegelung der Schnitte mit Histokitt und Deckgläsern.

Zum Anderen wurden zweidimensional wachsende Zellen bei der adipogenen und osteogenen Differenzierung direkt auf den Culture Slides fixiert. Nach Abnahme des Mediums und Spülen in PBS wurden osteogen differenzierte Zellen für die Alkalische Phophatase Färbung (siehe 2.2.9.5) mit einer Mischung aus Formalin, Aceton und Zitrat fixiert. Adipogen differenzierte Zellen wurden nach Abnahme des Mediums und Spülen in PBS für 40 Minuten in gepuffertem Formalin fixiert und mit der Oil Red O Färbung gefärbt (siehe 2.2.9.4). Nach Durchführung der Färbung wurde der Plastikaufsatz, welcher die einzelnen Kammern voneinander trennt, entfernt und die Objektträger mit flüssiger Glyceringelatine und Deckgläsern konserviert.

2.2.9.1 Hämatoxilin Eosin Färbung

Hämalaun ist ein natürlicher, basischer Farbstoff, der saure Bestandteile, insbesondere Nukleinsäuren im Zellkern, blau anfärbt. Eosin, eine synthetische Säure, färbt basische Substanzen, zum Beispiel Zellorganellen, Proteine und Zucker im Zytoplasma und EZM rosarot an. Nach der Fixierung und dem Entparaffinieren erfolgte die Inkubation für 5 Minuten in Hämalaunlösung nach Mayer und anschließend eine kurze Spülung mit destilliertem Wasser. Die Bindung des Farbstoffes fand im sauren Milieu statt. Um die blaue Färbung zu erhalten, musste anschließend ein pH-Wert über drei eingestellt werden, was durch Spülen unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten erreicht wurde. Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut in A.dest. gespült und mit Eosin G-Lösung für drei Minuten gegengefärbt.

2.2.9.2 PAS Färbung

Die PAS Färbung dient dem histologischen Nachweis von neutralen Mukopolysacchariden. Durch Inkubation in wässriger Perjodsäure für 10 Minuten wurden nicht substituierte Glykolgruppen zu Aldehyden aufgespalten und oxidiert. Durch Zugabe von SCHIFF Reagenz (fuchsinschwefelige Säure) für 30 Minuten entsteht ein purpurroter basischer Farbstoff. Überschüssiges SCHIFF Reagenz wurde durch Spülung mit Sulfitlösung differenziert entfernt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxilin Lösung.

2.2.9.3 Alzianblau und Alzianblau-PAS Färbung

Alzianblau ist ein basischer Farbstoff, welcher saure Mukopolysaccharide und Glykoproteine blau anfärbt, Zellkerne bleiben ungefärbt. Nach Überführen der Schnitte in 3% Essigsäure für 3 Minuten erfolgte die Inkubation in der Alzianblau Färbelösung für 30 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte in Essigsäure und in destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxilin bzw. mit der PAS Färbung.

2.2.9.4 Oil Red O Färbung

Diese Färbung dient dem qualitativen Nachweis intrazellulärer Lipidtropfen adipogen differenzierter Zellen. Nach Fixierung in Formalin erfolgte die Inkubation in 60-%igem Isopropanol für fünf Minuten. Anschließend wurden die Zellen mit der Oil Red O Färbelösung für 15 Minuten gefärbt. Nach Spülen mit Leitungswasser erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxilin nach Mayer.

2.2.9.5 Alkalische Phosphatase Färbung

Die Anfärbung des Enzyms Alkalische Phosphatase dient dem Nachweis einer osteogenen Differenzierung, da dieses Enzym vorwiegend von Knochenzellen exprimiert wird. Hierfür wurden die Zellen nach Entfernen des Kulturmediums mit PBS gespült und für 30 Sekunden in spezifischer Fixierlösung des AP Färbekits mit Formalin, Aceton und Zitrat fixiert. Nach kurzem Waschen in A.dest. erfolgte eine 12-minütige Inkubation mit Alkalifarbstoff in einer Dunkelkammer und anschließend eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxilin nach Gil II.

2.2.10 Immunhistochemische Methoden

Die Immunhistochemie ist eine Methode für den spezifischen Nachweis von Antigenen. Das Prinzip beruht auf der Bindung spezifischer, primärer Antikörper an das Antigen. Ein sekundärer Link Antikörper bindet an den primären Antikörper und sorgt durch eine enzymatische Reaktion für eine spezifische Farbreaktion. In dieser Arbeit wurde für alle immunhistochemischen Nachweise das Meerrettich-Peroxidase Kit LSAB+ von DAKO verwendet. Hierbei war der sekundäre Antikörper mit Biotin versehen. Anschließend wurde das Enzym Peroxidase, gebunden an Streptavidin, hinzugegeben und band das Biotin Molekül. In Anwesenheit eines Elektronendonators wurde die Peroxidase Reaktion gestartet. Durch Verwendung von Diaminobenzidin als Elektronendonator (Substrat) entsteht durch dessen Oxidation während der Peroxidasereaktion ein braunes, unlösliches Endprodukt. Um eine unspezifische Färbung zu verhindern, erfolgte die Durchführung mehrerer Blockadeschritte. Die endogene Peroxidasereaktion wurde dabei ebenso wie die im Gewebe vorhandenen Avidin und Biotin Bindungsstellen durch Zugabe entsprechender Blockade Lösungen vor der Inkubation mit dem Primärantikörper blockiert. Durch die 30-minütige Beschichtung der Proben mit Schweine Serum wurden unspezifische Antikörperbindungen verhindert. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte die gründliche Spülung der Schnitte in TBST Puffer. Die Proben wurden durch einen hydrophoben Stift umrandet, um die Gebrauchslösungen sparsam einsetzen zu können. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in TRIS/HCL mit einem Prozent BSA. Neben der nicht-differenzierten Kontrolle, die kein positives Färbeergebnis aufweisen sollte, wurde bei jeder Färbung eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Dies ist ein unspezifischer Antikörper, der in gleicher absoluter Konzentration wie der spezifische Antikörper angewendet wird und keine Farbreaktion zeigen sollte. Im Anschluss an die immunhistochemische Farbreaktion erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hämatoxilin. Die Schnitte wurden mit flüssiger Glyceringelatine und Deckgläsern konserviert.

Die verwendeten Protokolle bei den einzelnen Differenzierungssystemen unterschieden sich in der Fixierung sowie in der Konzentration und Inkubationsdauer der Primärantikörper.

Analog zu den histologischen Fixierungsmethoden (siehe 2.2.9) wurden größere, dreidimensionale Strukturen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach

dem Schneiden erfolgte das Trocknen auf Objektträgern für mindestens 24 Stunden und ein Antigen Retrieval, das bedeutet, das Freilegen von Paraffin blockierten Epitopen. Hierfür erfolgte die Inkubation bei 60°C über 10 Minuten sowie beim Nachweis von Kollagen Typ II ein anschließender enzymatischer Verdau mit Pronase und Hyaluronidase für je 15 Minuten im Brutschrank.

Bei Färbung von zweidimensional wachsenden Zellen der adipogenen und osteogenen Differenzierung in Culture Slides erfolgte die Fixierung nach initialen Spülschritten mit PBS in einem Methanol-Aceton Gemisch im Verhältnis sieben zu drei auf Eis über fünf Minuten.

Bei der chondrogenen Differenzierung wurden Antikörper gegen Aggrekan und Kollagen Typ I in einer Verdünnung zwischen 1:50 und 1:100 und mit einer Inkubationszeit von zwei Stunden verwendet. Der Antikörper gegen Kollagen Typ II wurde in einer Konzentration von 1:4000 mit einer halbstündigen Inkubationsdauer verwendet.

Bei der adipogenen Differenzierung wurde der AP-2 Antikörper 1:500 verdünnt und mit einer Inkubationszeit von zwei Stunden verwendet.

Bei der osteogenen Differenzierung wurde der Antikörper gegen Osteopontin 1:100 verdünnt und mit einer Inkubationszeit von zwei Stunden verwendet.

Bei der Differenzierung in Azinuszellen wurde der α-Amylase Antikörper 1:166 verdünnt, der Antikörper gegen Kallikrein 13 wurde 1:240 verdünnt. Der Antikörper gegen Vimentin zeigte bei einer Verdünnung von 1:1000 das beste Ergebnis. Die Inkubationsdauer betrug jeweils zwei Stunden.

2.2.11 Gewinnung von Gewebe für eine RNA-Isolation

Es wurden Proben von hSGSC in den Passagen drei, sechs, neun und zwölf gewonnen. Die Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium komplett abgenommen. Pro Flasche mit 25cm^2 wurde 600µl RLT Lysispuffer hinzugegeben, welcher 10µl Beta-Mercaptoethanol enthielt. Nach Verteilung auf der Wachstumsfläche und kurzer Inkubationszeit konnten die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in einen Qiashredder überführt werden. Nach Zentrifugation über zwei Minuten bei 13000 rpm wurde die Säule mit den Zellresten verworfen und das Eluat verschlossen und bei minus 80°C tiefgefroren.

Ebenso wurden Proben der in 25cm^2 Kulturflaschen osteogen und adipogen differenzierten Zellen nach sieben, 14 und 21 Tagen gewonnen.

Chondrogen differenzierte Pellets wurden nach Abnahme des Zellkulturmediums in Lysing Matrix Tubes überführt und in flüssigem Stickstoff und anschließend bei minus 80°C tiefgefroren. Nach entsprechender Bearbeitung der Proben mit einem Schüttler konnte die RNA extrahiert werden.

Für die Differenzierung in Azinuszellen wurden verschiedene Verfahren verwendet, um das Problem der geringen Zellzahl zu lösen. Zum Einen ist es möglich, die Matrix mit Matrigel Recovery Solution zu verdauen. Diese Lösung ermöglicht im Gegensatz zur Verwendung von Elastase einen Verdau der Matrix, ohne die Zellen oder die enthaltene DNA/RNA zu zerstören. Hierfür wurde das Medium vorsichtig von der Matrix entfernt und die wells mehrfach mit kalter PBS Lösung gespült. Ab hier erfolgten alle Arbeiten auf Eis. Anschließend erfolgte die Zugabe von Recovery Solution 400µl pro well und die Inkubation für 20 Minuten auf Eis. Durch Penetration der Matrix mit einer Pipettenspitze konnte der Vorgang optimiert werden. Die gelöste Matrix mit den nun losen Zellaggregaten wurde in ein steriles Tube überführt und das well wurde erneut mit 200µl Recovery Solution gespült. Anschließend erfolgte erneut eine 20 minutige Inkubation auf Eis. Nach einem Waschschritt mit PBS und Zentrifugation konnte das Zellpellet in 600µl RLT Lysis Puffer mit 10µl Beta-Mercaptoethanol resuspendiert und in Qiashreddern zentrifugiert werden. Zum anderen wurden analog zum Vorgehen bei der chondrogenen Differenzierung die großen, makroskopisch sichtbaren Aggregate entnommen, in Lysing Matrix Tubes überführt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Gewinnung der RNA erfolgte dann in RLT Puffer mit einem mechanischen Schüttler.

Alle Arbeiten mit RNA erfolgten unter dem Abzug mit sterilen und RNA/DNA freien Materialien.

2.2.12 Vergleichende Untersuchungen an hBMSC

Analog zu den Arbeiten mit hSGSC wurden die Experimente auch mit hBMSC vergleichend durchgeführt. Hierfür wurde kommerziell erwerbliches, nicht prozessiertes, gesundes Knochenmark verwendet. Initial wurden 5ml Knochenmark in 31ml Kulturmedium in einer 150cm^2 Flasche ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Medium mit den nicht adhärenten Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. hBMSC waren zu diesem Zeitpunkt bereits adhärent und konnten so weiter kultiviert und kryokonserviert werden. Die hBMSC wurden durchflusszytometrisch analysiert und adipogen, osteogen, chondrogen sowie in Azinuszellen differenziert.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hSGSC isoliert und charakterisiert. Die Zellen wurden über mehrere Passagen kultiviert und ihre Oberflächenantigene untersucht. Die hSGSC wurden in die mesenchymalen Grundgewebe Fett, Knochen und Knorpel differenziert, anschließend wurde die in-vitro Fähigkeit zur Differenzierung in Azinuszellen untersucht.

3.1 Isolation und Kultivierung von hSGSC

Es wurden insgesamt 21 Speicheldrüsenpräparate zur Isolierung von hSGSC verwendet, 2 Präparate stammten von der Glandula submandibularis, die übrigen 19 Präparate von der Glandula parotis. Die Gewinnung der Speicheldrüsenpräparate fand im Rahmen von Parotidektomien oder Neck Dissections statt. Die Zustimmung der Ethikkommission sowie das Einverständnis der Patienten zur Verwendung des entnommenen Gewebes für Forschungszwecke lagen vor. Verwendet wurde ausschließlich nicht pathologisch verändertes Material, welches im Rahmen der Operationen standardmäßig entfernt werden musste.

Drei Gewebeproben wurden nachträglich ausgeschlossen, so dass im Folgenden 18 Präparate berücksichtigt wurden. Bei den nicht berücksichtigten Präparaten handelte es sich in einem Fall um ein malignes Parotis Karzinom und in einem weiteren Fall um Gewebe eines monomorphen Adenoms. Bei einem weiteren Präparat handelte es sich um bereits bestrahltes Parotisgewebe. Anteile aller Proben wurden vor der Durchführung weiterer Versuche histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet, um die Morphologie der Speicheldrüsen zu charakterisieren.

Häufigste Diagnose, die zur einseitigen Parotidektomie führte, war das pleomorphe Adenom.

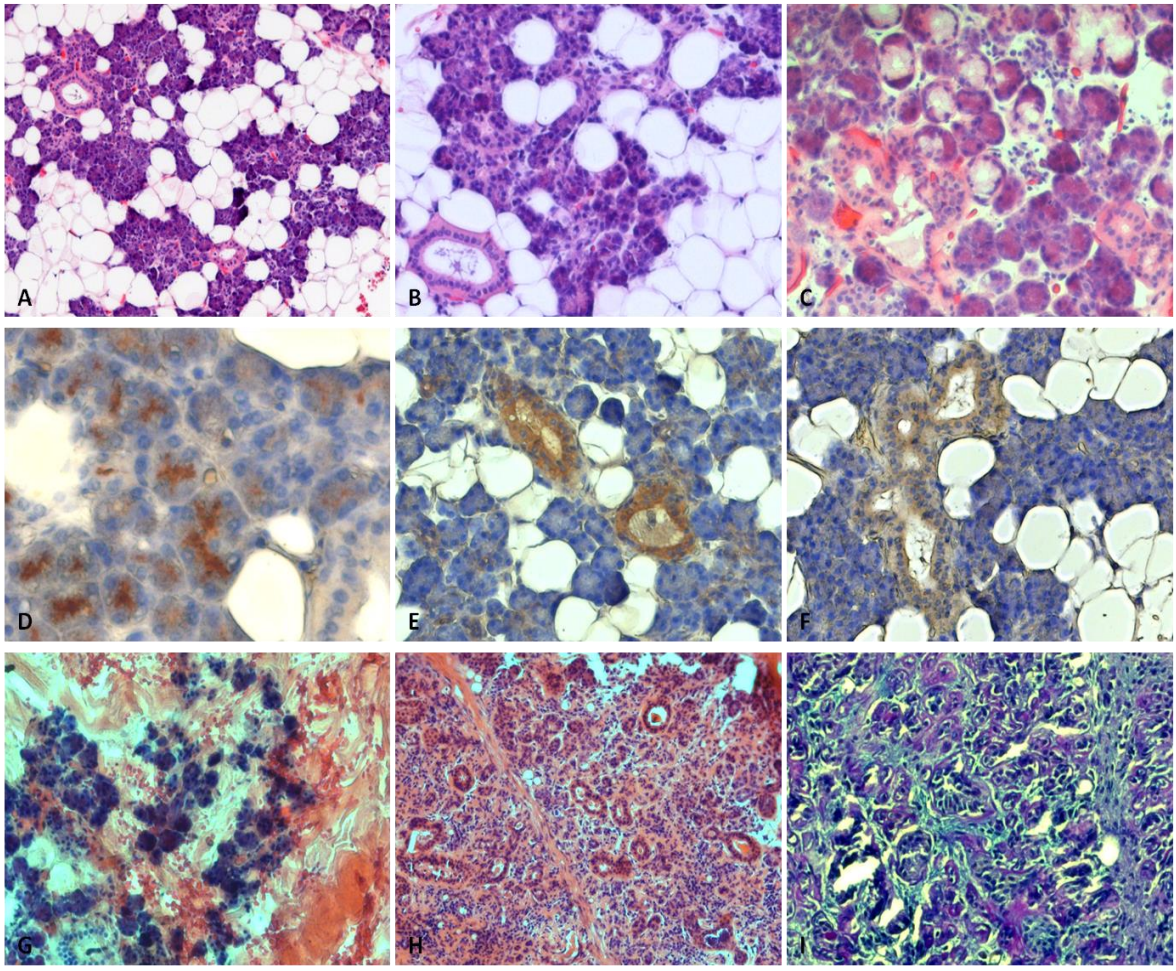


Abb. 10: Histologische und immunhistochemische Darstellung von humanen Speicheldrüsenpräparaten. Glandula Parotis in der HE Färbung (A,B) mit zunehmender Vergrößerung (A=10x, B=20x). Man erkannte das für die Parotisdrüse typische Fettgewebe, Ausführungsgänge und seröse Azini. Je mehr Granula in den Zellen erhalten waren, desto azidophiler und damit eosinophiler färbte sich das Zytoplasma an. Die Zellkerne waren wie üblich basophil und somit blau angefärbt. In der Glandula Submandibularis erkannte man in der HE Färbung neben den serösen, azidophilen Azini auch schwächer gefärbte, blass erscheinende muköse Endstücke, oftmals mit einem serösen Halbmond versehen (C, 20x). Immunhistochemisch lies sich die luminale Amylasesekretion der Azini darstellen (D, 40x). Duktale Zellen zeigten eine spezifische Färbung mit den Markern Vimentin (E, 20x) und Kallikrein 13 (F, 20x). Im Gegensatz zum gesunden Speicheldrüsengewebe zeigte die Histologie des monomorphen Adenoms eine deutlich aufgelöste Struktur mit nur noch wenigen, intakten Azini und viel pathologischem Bindegewebe (G, 10x). Die radiogene Speicheldrüsenschädigung im finalen Stadium der Fibrose war in Bild H (5x, HE) zu erkennen. Neben der massiven Fibrose waren kaum intakte Azini zu erkennen. Das Bindegewebe färbte sich in der Alzianblau - PAS Färbung blau an, intakte Azini waren schwach rosa angedeutet (I=20x). A,B,D,E,F= nicht pathologisch verändertes Parotisgewebe; C= nicht pathologisch verändertes Submandibulargewebe; G= monomorphes Adenom; H,I= bestrahltes Parotisgewebe. HE= Hämatoxilin Eosin; PAS= Periodic acid Schiff reaction; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

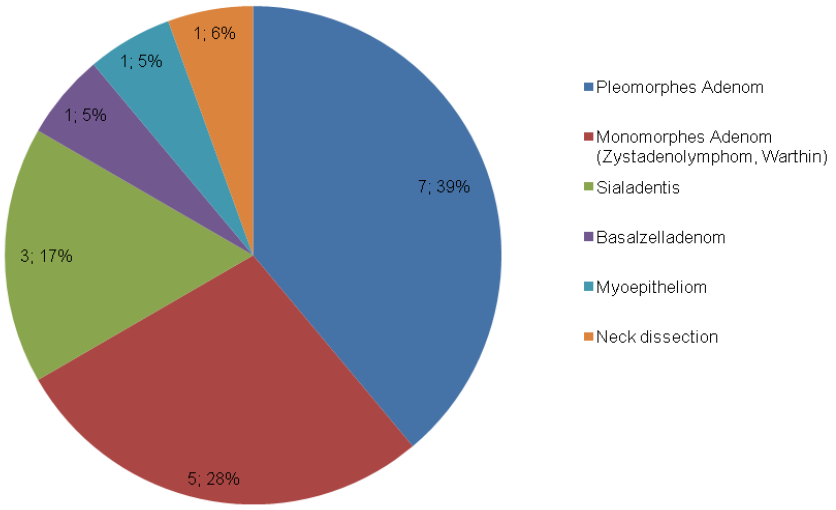


Abb. 11: Ursprung der Speicheldrüsenpräparate (n=18). Absolute Anzahl und prozentualer Anteil an Diagnosen, die zur Entfernung der Glandula parotis bzw. der Glandula submandibularis führten. Es wurde ausschließlich gesundes Material für die Isolation der hSGSC verwendet. Mit sieben Fällen war das pleomorphe Adenom vor dem monomorphen Adenom mit fünf Fällen der häufigste Grund für den Eingriff. hSGSC= human Salivary Gland Stem Cells.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug im Mittelwert 55,2 Jahre (Standardabweichung +/- 20,2). Es erfolgte eine orientierende statistische Auswertung der anamnestischen Angaben der Patienten, um mögliche Einflussfaktoren auf das Wachstumsverhalten zu erkennen. Für eine statistisch signifikante Aussage war das Patientenkollektiv zu klein. Insgesamt zeigte sich kein relevanter Zusammenhang zwischen primär vorhandenem Wachstum und Patientenalter, Geschlecht, Hauptdiagnose, Medikamenteneinnahme oder Nikotin- und Alkoholkonsum.

Insgesamt zeigte sich in 13 der 18 angelegten Kulturen innerhalb von sechs Wochen ein Wachstum von adhärenten Zellen, so dass eine Passagierung stattfinden konnte. In den anderen Fällen waren keine adhärenten Zellen zu detektieren.

Als Vergleichsgruppe für Wachstum, Morphologie, Immunphänotyp und Differenzierungspotenzial wurden drei Kulturen hBMSC von gesunden Spendern angelegt und parallel kultiviert.

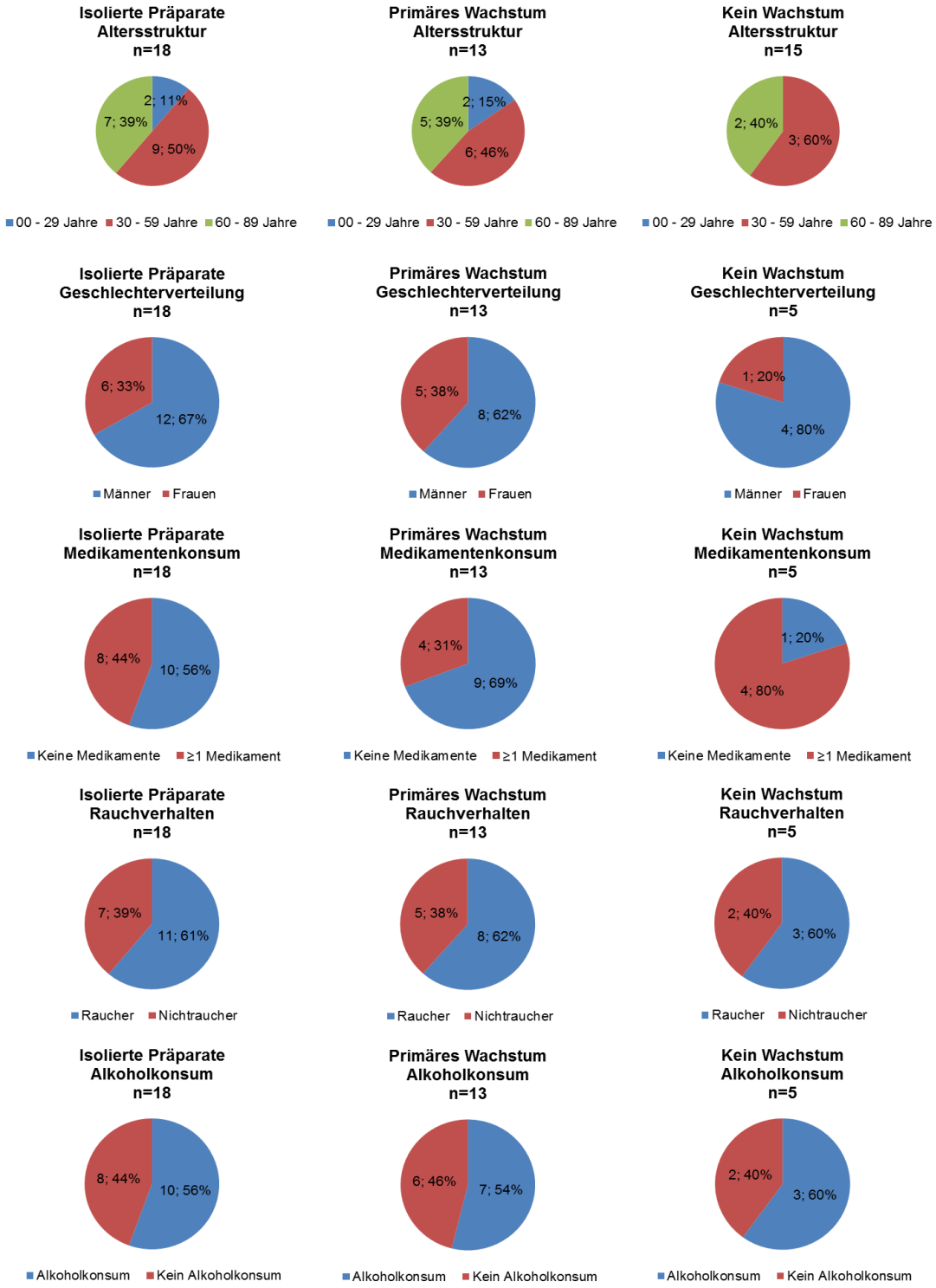


Abb. 12: Darstellung des Patientenkollektivs. Vergleich von Alter, Geschlecht, Medikamenteneinnahme, Nikotinkonsum und Alkoholkonsum zwischen allen isolierten Präparaten und primär gewachsenen bzw. nicht gewachsenen Kulturen. Von den 18 isolierten Präparaten war in 13 Fällen ein Wachstum innerhalb der ersten sechs Wochen vorhanden. In fünf Fällen war kein Wachstum detektierbar. Die meisten Patienten befanden sich in der Altersgruppe zwischen 30 und 59 Jahren. Es fand sich kein relevanter Unterschied in Bezug auf Wachstum/kein Wachstum und zunehmendes Patientenalter. Der überwiegende Anteil der Patienten war männlich. Im Medikamentenverhalten zeigte sich ein deskriptiver Zusammenhang zwischen Medikamentenkonsum sowie primärem Wachstumsverhalten. Wenn Medikamente konsumiert wurden, standen die Chancen auf primär einsetzendes Wachstum in der Zellkultur schlechter als ohne Medikamenteneinnahme. Nikotin- und Alkoholkonsum schienen keinen Einfluss auf das Wachstum zu haben

Die primäre Selektion der hSGSC und der hBMSC erfolgte aufgrund ihrer Eigenschaft der Plastikadhärenz auf Polystyrol Zellkulturflaschen. Nicht adhärente Zellen wurden bei Mediumwechsel und Passagierung entfernt.

Die Morphologie der hSGSC und der hBMSC war weitgehend identisch mit dem für MSC typischen, Fibroblasten-ähnlichen Bild mit reichlich cytoplasmatischen Granulationen. Dabei konnten initial zwei Populationen unterschieden werden. Zum Einen breite, großflächige Zellen mit einer Größe von etwa 100 bis 160µm Länge und 40 bis 50µm Breite, welche nur langsam proliferierten und keine absolute Konfluenz erreichten. Zum Anderen lange, spindelförmige Zellen mit einer Länge bis 450µm und einer Breite bis 40µm, welche stark proliferierten und rasch konfluierten. Es zeigte sich, dass das Verhältnis zwischen breiten und spindelförmigen Zellen nach Isolation von Patient zu Patient unterschiedlich war, demnach zeigten einige Kulturen eine stärkere Proliferation als andere. Mit zunehmender Kultivierungsdauer verloren die Zellen ihre spindelförmige Gestalt, wurden großflächiger und hatten eine reduzierte Proliferationskapazität.

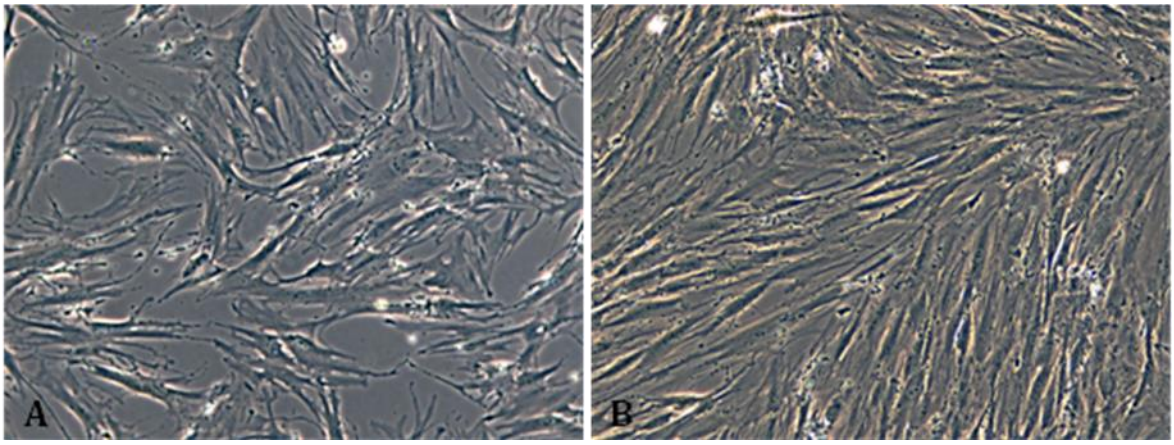


Abb. 13: Phasenkontrastaufnahme von hSGSC. Darstellung von hSGSC in Passage drei, fünf Tage (A) bzw. zehn Tage (B) nach Aussaat (10x). Typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie mit langen, bipolaren spindelförmigen Zellen, welche rasch konfluieren. hSGSC= human Salivary Gland Stem Cells; 10x= 10fache Objektivvergrößerung.

In allen 13 Fällen setzte das primäre Wachstum innerhalb der ersten sechs Wochen ein. Meist blieb das Wachstum innerhalb der ersten 10 Passagen hoch und fiel anschließend langsam ab. Die Zellen konnten über maximal 17 Passagen kultiviert werden. Die Vitalität der Kulturen lag im gesamten Zeitraum über 95% und nahm erst während der letzten Passagen ab.

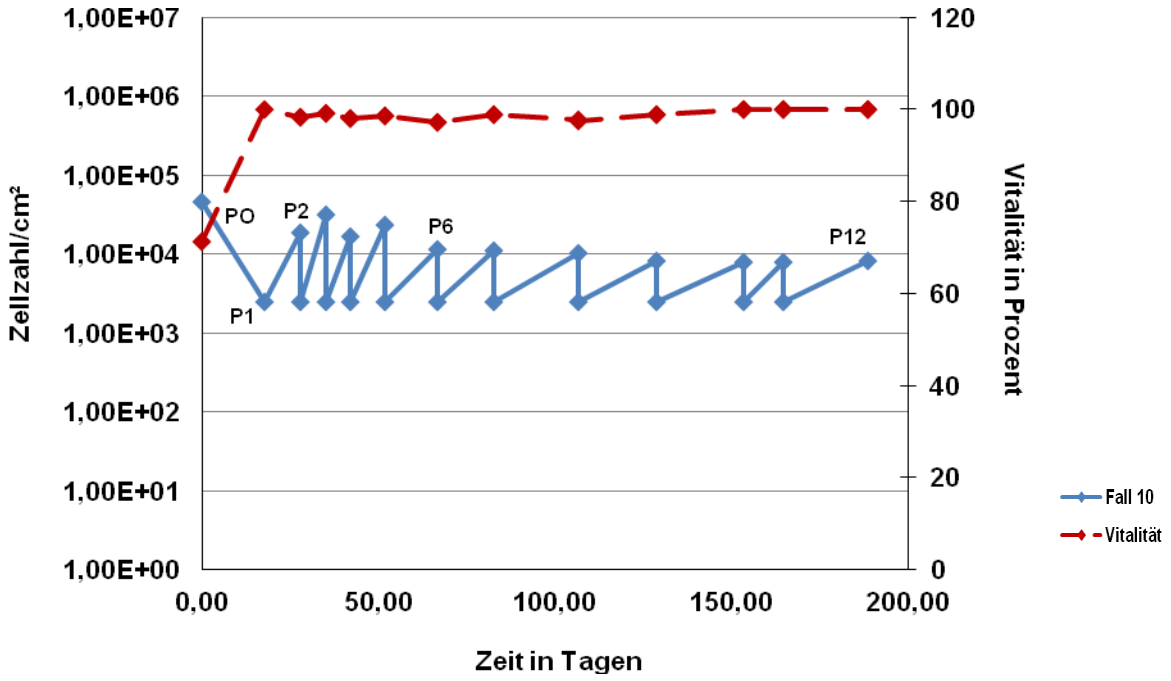


Abb. 14: Exemplarisches Wachstumsverhalten und Vitalität von Fall 10 über 12 Passagen. Auf der Abszisse ist die Kulturdauer in Stunden, auf der linken Ordinate ist die Zellzahl pro cm^2und auf der rechten Ordinate die Vitalität in Prozent dargestellt. Die Vitalität lag initial bei etwa 70%, anschließend bis Ende der Kulturdauer bei annähernd 100%. Nach Aufbereitung der Zellen (PO) wurden etwa $4{,}5x10^5$ Zellen gezählt. Nach Erreichen der nötigen Konfluenz wurden $2{,}5x10^3$ Zellen gezählt (P1) und ausgesät. In P2 wurden circa $1{,}9x10^4$ Zellen gezählt und mit einer Dichte von 2500 Zellen/cm^2 ausgesät. In den anschließenden Passagen blieb das Wachstum hoch, bis in P6 sich das Wachstum erstmals verringerte, dargestellt durch eine Abflachung im Kurvenanstieg. Nach P12 wurde die Kultur beendet. P= Passage.

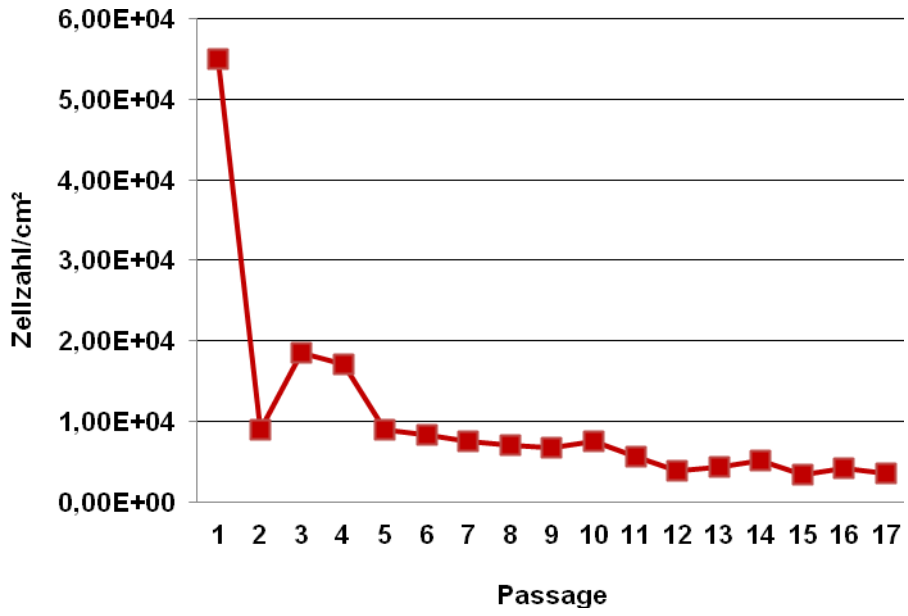


Abb. 15: Wachstumsverhalten von hSGSC (=10). Auf der Abszisse ist die Passage, auf der Ordinate die durchschnittliche Zellzahl pro cm^2 bei Passagierung der Zellen angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert aus zehn Kulturen. Die Zellzählung erfolgte bei Erreichen von makroskopisch circa 95%-iger Konfluenz. hSGSC= human Salivary Gland Stem Cells.

3.2 Immunphänotypische Charakterisierung der hSGSC

Die Analyse der Oberflächenantigene der Zellen mit dem oben dargestellten FACS Antikörper Panel bestätigte die Stammzellcharakteristik der hSGSC. Es wurden insgesamt neun Populationen in Passage drei untersucht. Drei Kulturen wurden auch in höheren Passagen kontrolliert, um eine mögliche Zu- oder Abnahme der Expression zu beobachten.

Die statistische Analyse mittels T-Test nach Auswertung der Dot-Blots ergab folgendes Expressionsprofil.

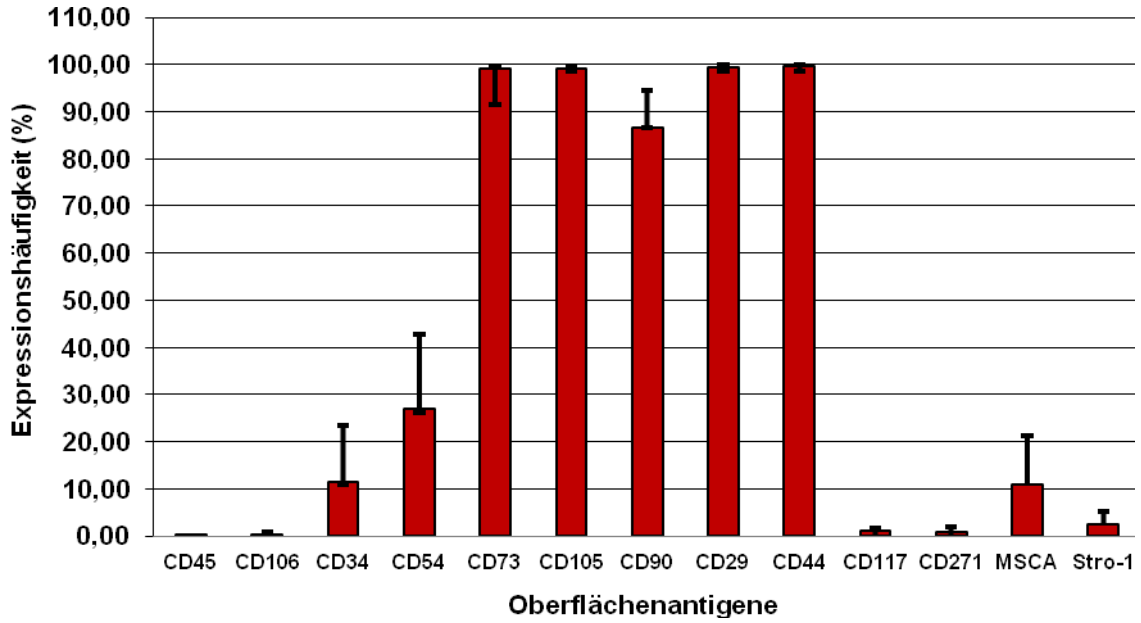


Abb. 16: Mittelwert und Standardabweichung der Durchflusszytometrie von hSGSC in Passage 3 (n=9). Expressionsprofil von neun Kulturen hSGSC nach statistischer Analyse mittels T-Test von Dot-Blot Diagrammen. Auf der Abszisse sind die Antigene dargestellt, auf der Ordinate der durchschnittliche Prozentsatz positiver Zellen, welche dieses Antigen exprimierten. Zusätzlich Darstellung von Delta X als Maß für die Standardabweichung. hSGSC= human Salivary Gland Stem cells.

Es zeigte sich, dass die klassischen MSC Antigene CD44, CD73, CD105, CD90 und CD29, wie sie auch von hBMSC exprimiert werden, mit einer Expressionshäufigkeit größer 90% stark positiv waren. Die hämatopoetischen- und Endothelzellmarker CD45 und CD106 waren negativ. CD34 positive Zellen waren in fast allen untersuchten Kulturen zu finden. Der Mittelwert lag bei 11,4% und variierte zwischen 0,1% und 45%. CD54 zeigte ebenfalls eine teilweise positive Expression von durchschnittlich 27%.

Bei der Analyse der neueren Stammzellmarker fiel eine Heterogenität auf. Der Anteil der CD117 und CD271 positiven Zellen lag im Mittelwert bei knapp unter einem Prozent und lag zwischen 0,2% und 3% positiven Zellen. Durchschnittlich 10,8% der Zellen exprimierten MSCA-1, in drei Kulturen lag der Anteil positiver Zellen über 15%. STRO-1 war mit 2,5% positiven Zellen in manchen Kulturen ebenfalls als Subpopulation exprimiert.

Eine Darstellung der Expression als Histo-Blots zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die positiven Marker CD44, CD73, CD105, CD29, CD90 und CD54 waren wie auch die negativen Marker CD45, CD106 und CD34 in dieser Darstellung gut analysierbar. Die Marker CD117, CD271, STRO-1 und insbesondere MSCA-1 zeigten ebenfalls eine deutliche Expression. In Abbildung ist dies beispielhaft anhand einer Zellpopulation dargestellt.

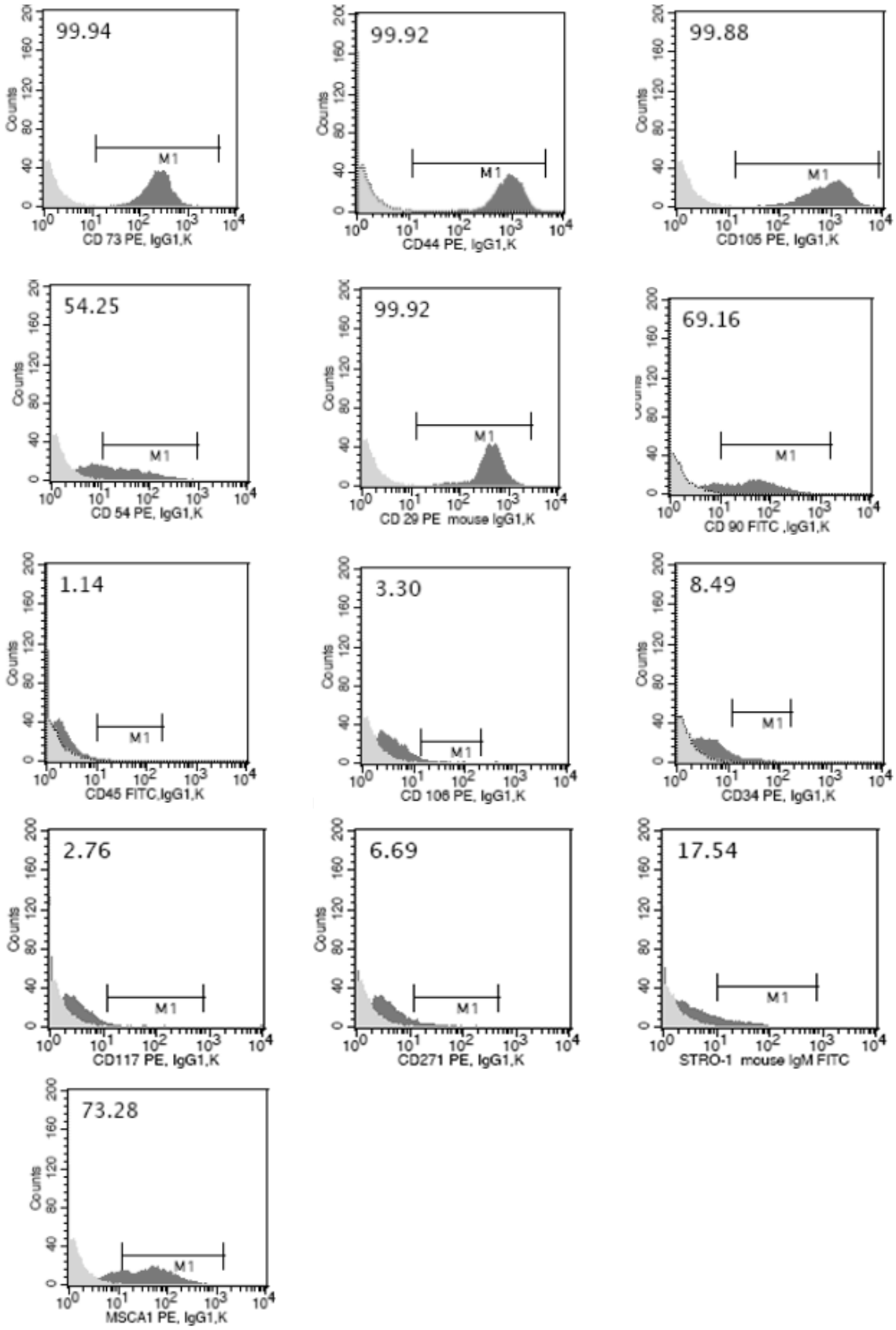


Abb. 17: Expression der Oberflächenmarker von hSGSC. Darstellung der Expression der einzelnen Marker in Histo-Blots. Der Balken M1 zeigt den Bereich der Zellen an, welche das Antigen exprimieren. hSGSC= human Salivary Gland Stem cells.

Eine weitere Darstellung der Ergebnisse erfolgte über die Berechnung des Delta Median, wobei die mediane Fluoreszenzstärke der Isotype mit dem gefärbten Antikörper verglichen wurde. Bei gleicher Fluoreszenzstärke von Isotype und Antikörper war der Wert nahe Null. Je größer der Wert, desto stärker die Expression des Antigens.

In dieser Darstellung bestätigten sich die positiven Ergebnisse für die MSC Marker CD44, CD73, CD105, CD29, CD90 und CD54 mit einem medianen Anstieg der Fluoreszenzintensität im dreistelligen Bereich im Vergleich zur Isotype. CD45 zeigte eine nahezu identische Intensität mit der Isotype und wurde somit weder quantitativ noch qualitativ exprimiert. CD106 zeigte eine geringe mediane Zunahme der Fluoreszenzintensität. CD34 stellte sich hier mit einer durchschnittlichen medianen Fluoreszenzintensität von 12 dar. Auch in dieser Darstellung zeigte sich eine heterogene Expression mit deutlichem Intensitätsanstieg bei MSCA-1 und geringeren Anstiegen für CD117, CD271 und STRO-1.

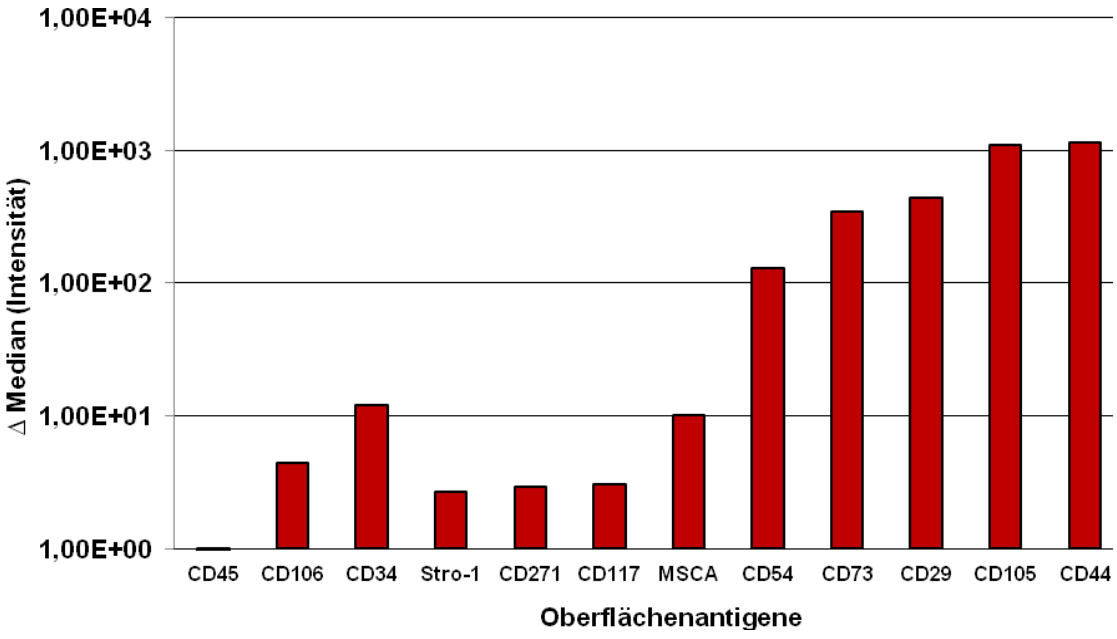


Abb. 18: Medianer Intensitätsunterschied zwischen Isotype und Antikörper in der Durchflusszytometrie bei hSGSC in Passage 3 (n=9). Statistische Analyse mittels T-Test des medianen Fluoreszenzunterschiedes ∆Median zwischen Isotype und Antikörper. Auf der Abszisse sind die Antigene dargestellt, auf der Ordinate die Differenz der durchschnittlichen medianen Intensität zwischen Isotype und Antikörper. Je höher der Wert, desto stärker die Expression des Antigens. hSGSC= human Salivary Gland Stem cells.

Im Zeitverlauf zwischen Passage drei und Passage neun war die Expression der meisten untersuchten MSC Marker stabil. Auch einzelne Untersuchungen in höheren Passagen zeigten keine wesentlichen Veränderungen. Es zeigte sich aber die bereits von anderen Autoren beschriebene Tendenz, dass die Marker CD271, Stro-1 und MSCA-1 im Zeitverlauf weniger stark exprimiert wurden. Bei MSCA-1 sank die durchschnittliche Expression von 46% in Passage drei auf 23% in Passage neun. In allen drei Kulturen handelte es sich um Fälle mit einem überdurchschnittlich hohen Anteil MSCA-1 positiver Zellen. Rein deskriptiv war mit dem Verlust der Antigene auch eine Reduktion der Proliferationsgeschwindigkeit sowie der Differenzierungsfähigkeit zu beobachten. Allerdings ließ sich aufgrund der geringen Fallzahl und der verwendeten Methoden hier kein kausaler Zusammenhang herstellen.

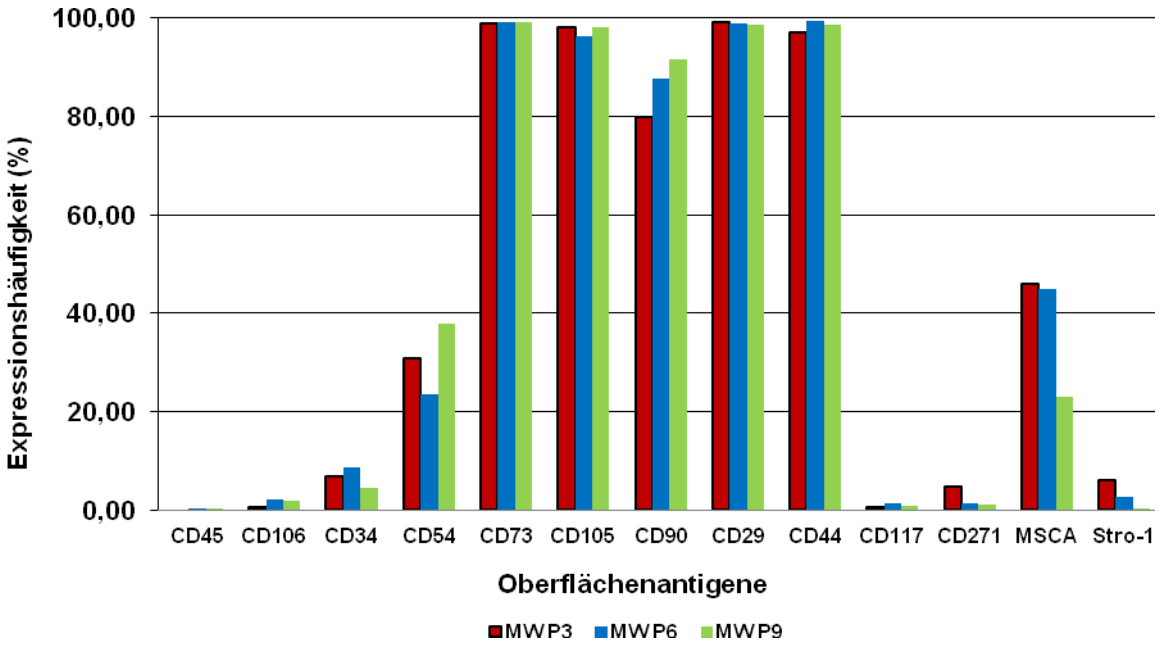


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker von hSGSC in Passage 3,6 und 9 (n=3). Auf der Abszisse sind die Antigene dargestellt, auf der Ordinate der Anteil positiver Zellen nach Analyse der Dot-Blots durch Bildung des statistischen Mittelwertes. hSGSC= human Salivary Gland Stem cells, MW= Mittelwert, P= Passage.

Vergleichend zu den hSGSC wurden drei Populationen von hBMSC durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse waren nach Analyse der Dot-Blots und Berechnung des statistischen Mittelwertes vergleichbar mit dem Expressionsmuster der hSGSC. Auffallend war jedoch, dass die Zahl CD34 positiver Zellen nur bei 0,2% lag. Die Stammzellantigene CD117, Stro-1, CD271 und MSCA-1 waren bei den hBMSC weniger stark exprimiert als bei den hSGSC.

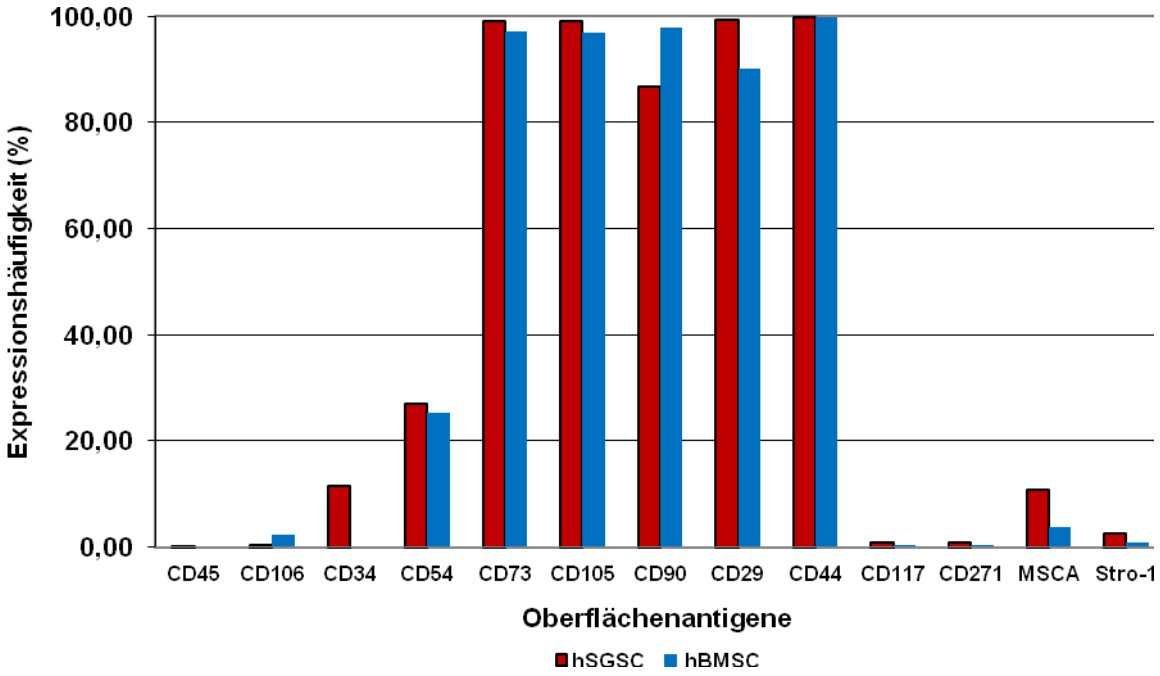


Abb. 20: Vergleich des Immunphänotyps zwischen hSGSC und hBMSC. Ergebnisse der Durchflusszytometrie von hSGSC (n=9) und hBMSC (n=3) nach statistischer Analyse mittels T-Test der Dot-Blots in Passage 3. Auf der Abszisse sind die Antigene dargestellt, auf der Ordinate der durchschnittliche Prozentsatz positiver Zellen, welche dieses Antigen exprimierten. hBMSC= human Bone Marrow Stem cells, hSGSC= human Salivary Gland Stem cells.

Es war auffällig, dass drei hSGSC Kulturen ein verstärktes Wachstum zeigten. Diese zeigten auch bei der Analyse der Oberflächenantigene eine verstärkte Expression einzelner Stammzellmarker. In zwei Fällen betrug die Anzahl der STRO-1 positiven Zellen 6,84 bzw. 7,76% gegenüber durchschnittlich 2,46%. Die Intensität der Expression betrug im Median 3,29 bzw. 6,22 im Vergleich zum Durchschnitt von 2,68. In einem Fall (Fall 10, siehe Abbildung 21) betrug die Anzahl MSCA-1 positiver Zellen 37,36% gegenüber durchschnittlich 10,81%. Der Median der Fluoreszenzintensität lag mit 31,24 deutlich über dem Mittelwert von 10,15. Auffallend niedrig war in zwei dieser drei genannten Kulturen der Anteil der CD34 positiven Zellen mit etwa einem Prozent.

Um genauere Einflüsse dieser Oberflächenantigene auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten beschreiben zu können, war die Anzahl der Populationen zu gering.

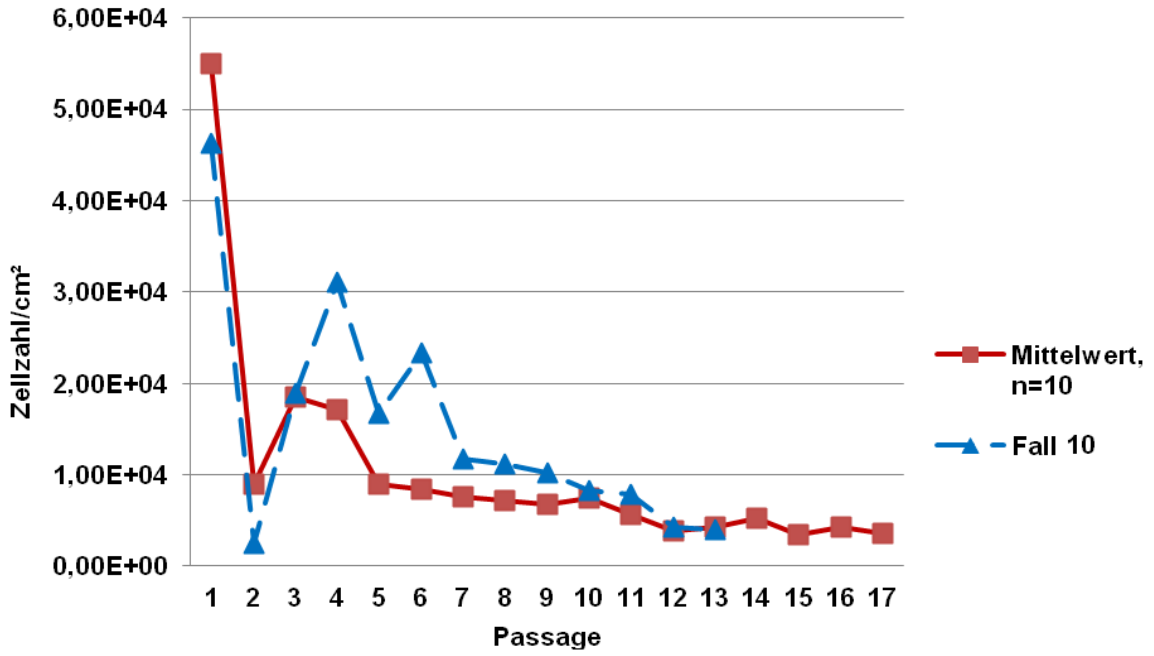


Abb. 21: Vergleichendes Wachstumsverhalten der hSGSC. Auf der Abszisse ist die Passage, auf der Ordinate die Zellzahl pro cm² bei Passagierung der Zellen angegeben. In den ersten Passagen zeigte sich in Fall 10 ein deutlich stärkeres Wachstum, bevor es sich dem durchschnittlichen Wachstum anglich. hSGSC= human Salivary Gland Stem cells.

Für eine genauere Darstellung und Charakterisierung eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen überdurchschnittlicher Expression einzelner Marker und verbessertem Proliferations- und Differenzierungsverhalten erfolgte die Isolation einzelner MSCA-1 positiver Zellen mit der MACS Methode. Die Ergebnisse zeigten eine ungenügende Genauigkeit der Separation. Es wurden nur etwa 0,5% MSCA-1 positive Zellen von der gesamten Zellzahl separiert, obwohl nach durchflusszytometrischer Analyse über 15% der Zellen das MSCA-1 Antigen exprimierten. Im weiteren Verlauf der Kultivierung kam es zu einer Abnahme der Vitalität der MSCA-1 positiven Kultur von 100% in der ersten Passage auf 93% in der dritten Passage bzw. bei den MSCA-1 negativen Zellen von 100% in der ersten Passage auf 88% in der dritten Passage.

Die Proliferationskapazität der Zellen war im Vergleich zu nicht selektierten Kulturen schwach ausgeprägt. Bei maximaler Expansion der Zellen stieg die Gesamtzellzahl der MSCA-1 positiven Zellen über einen Zeitraum von 62,5 Tagen von $8{,}1 \times 10^3$ auf $5{,}1 \times 10^4$, die Anzahl der MSCA-1 negativen Zellen war im selben Zeitraum rückläufig.

3.3 Differenzierungspotenzial von hSGSC

In dieser Arbeit wurden hSGSC in drei mesenchymale Grundgewebe differenziert .

3.3.1 Adipogene Differenzierung

Der Nachweis der adipogenen Differenzierung erfolgte mittels histologischer Darstellung der intrazellulären Lipidkörper durch Oil Red O Färbung und durch den immunhistochemischen Nachweis des AP-2 Proteins nach sieben, 14 und 21 Tagen.

Morphologisch zeigte sich auch ungefärbt eine Veränderung der induzierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. In der Kontrollgruppe proliferierten die Zellen wie gewöhnlich und behielten ihr spindelförmiges Aussehen bis zum 21. Tag in Kultur. In den adipogen differenzierten Zellen schien es primär zu einem Wachstumsstopp zu kommen, gefolgt von einer klonalen Proliferation. Bereits nach sieben Tagen hatten die Zellen eine sphärische Form und erste zytoplasmatische Vakuolen ließen sich beobachten.

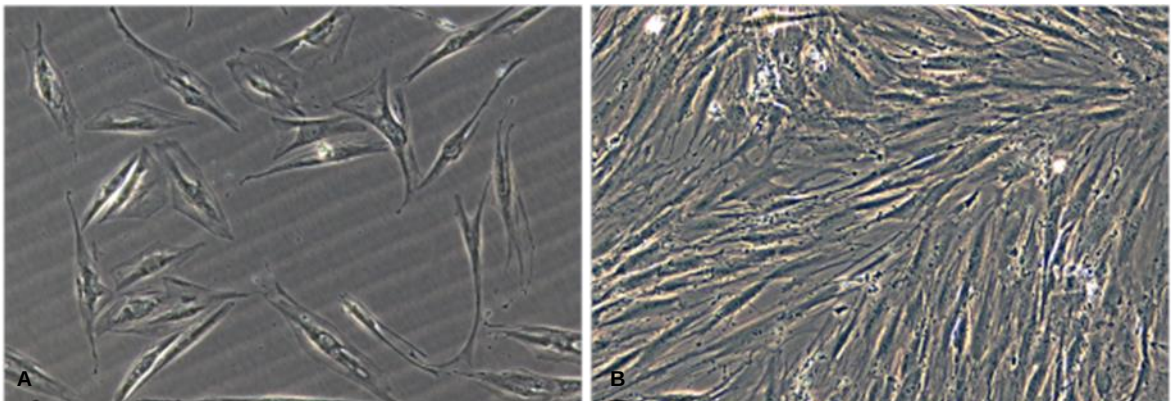


Abb. 22: Adipogene Differenzierung von hSGSC an Tag 14 im Phasenkontrastmikroskop. Darstellung der adipogenen Differenzierung (A) und Kontrolle (B) in Zellkulturflaschen nach 14 Tagen (10x) im Phasenkontrastmikroskop. Die adipogen induzierten Zellen proliferierten nur geringfügig und erlangten eine zunehmend sphärische Form mit zytoplasmatischen Vesikeln. In normalem Kulturmedium behielten die hSGSC ihre typische Spindelform und Proliferationsfähigkeit. hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x= 10fache Objektivvergrößerung.

Histologisch gelang der Nachweis der Lipidtropfen mittels Oil Red O Färbung bereits ab dem siebten Tag. In der Kontrollgruppe waren keine roten Fettvakuolen zu beobachten. Ebenso war die verminderte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen zu sehen sowie die sphärische Form der Zellen.

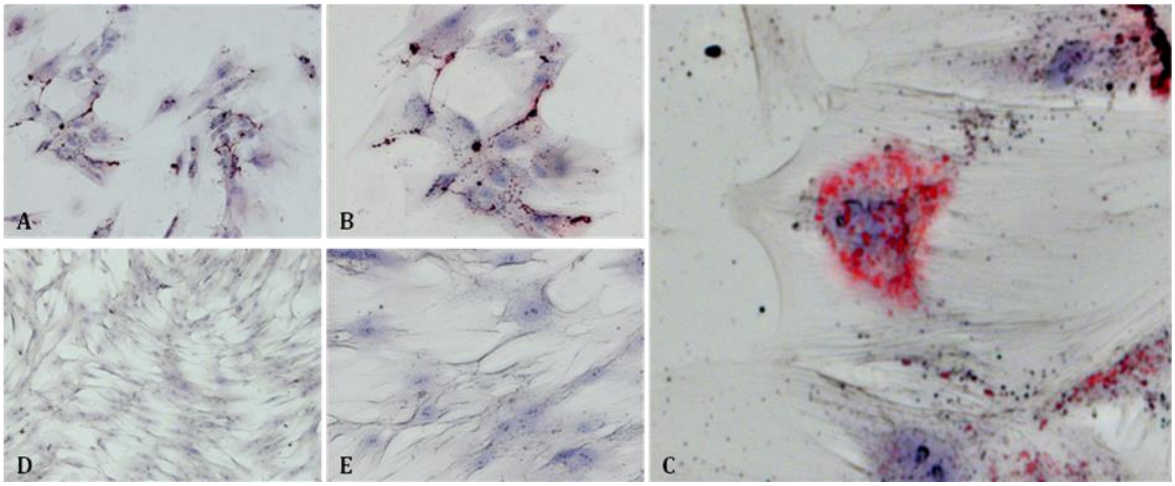


Abb. 23: Adipogene Differenzierung von hSGSC in der Oil Red O Färbung. Die Zellkerne sind blau dargestellt, Fettvesikel erscheinen hellrot. In der Induktionsgruppe waren nach 14 Tagen eindeutig zytoplasmatische Fettvesikel nachweisbar (A=5x, B=20x, C=40x), die Kontrollzellen zeigten eine eher spindelförmige Morphologie, ein dichteres Wachstum und keine Fettvesikel (D=10x, E=20x). hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

Immunhistochemisch war die Expression des AP-2 Proteins in der induzierten Zellkohorte ebenfalls ab dem siebten Tag zu detektieren. Hier zeigte sich eine deutliche Zunahme der Farbintensität bis zum 21. Tag bei negativer Kontrolle und negativer Isotype.

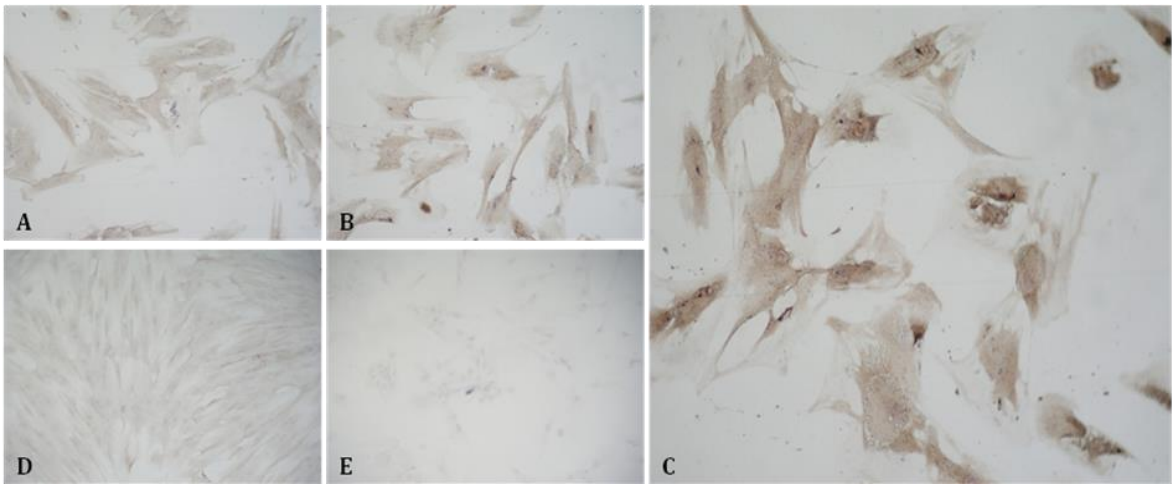


Abb. 24: Adipogene Differenzierung von hSGSC in der AP2 Immunhistochemie. Die Zellkerne sind blau dargestellt, der Antikörper ist braun gefärbt. In der Induktion war eine Zunahme der Färbeintensität nach 7(A), 14(B) und 21 Tagen (C) zu erkennen (20x). In der Kontrolle zeigte sich keine Antikörperbindung, dafür die typische hSGSC Morphologie (D, 10x). Die Isotypenfärbung war in der Induktionsgruppe bei typischer, adipogen differenzierter Morphologie negativ. (E, 10x). AP-2= Adipocyte Protein 2; hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

Vergleichend wurden hBMSC adipogen induziert. Hierbei zeigte sich ein positives Ergebnis in der Oil Red O Färbung mit großen und intensiv gefärbten Lipidtropfen und eine vergleichbar starke Intensität in der Immunhistochemie.

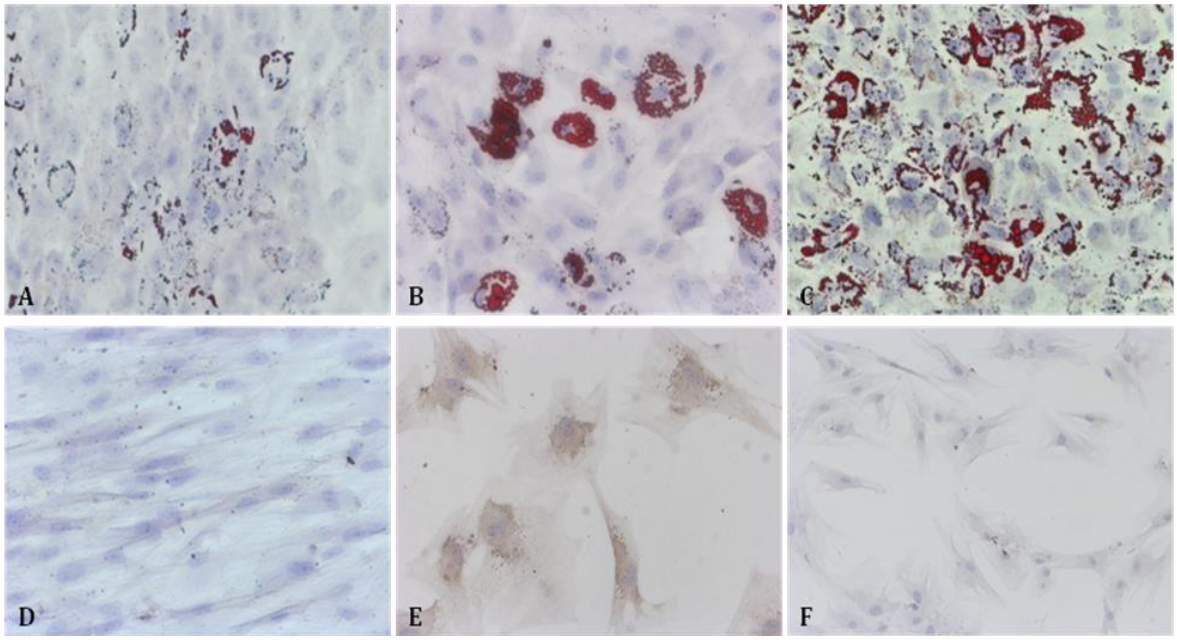


Abb. 25: Adipogene Differenzierung von hBMSC. Oil Red O Färbung nach 7(A), 14(B) und 21 Tagen (C). Die Zellkerne sind blau dargestellt, Fettvesikel erscheinen hellrot. Bei fortschreitender Kulturdauer war eine Zunahme der Anzahl und Größe der Vesikel der induzierten Zellen sowie eine zunehmend sphärische Form der Zellen zu beobachten. Die Kontrollzellen zeigten diese Veränderungen nicht und behielten ihr spindelförmiges Aussehen (D=21 Tage). In der Immunhistochemie mit dem AP2 Antikörper sind die Zellkerne blau dargestellt, der Antikörper braun. Bereits nach 7 Tagen (E) zeigte sich ein positives Ergebnis für AP2, die Isotypenkontrolle war zum gleichen Zeitpunkt negativ. Alle Abbildungen mit 20facher Objektivvergrößerung. AP2= Adipocyte Protein 2; hBMSC= human Bone Marrow Stem cells.

3.3.2 Chondrogene Differenzierung

Die Differenzierung der hSGSC in Knorpelzellen erfolgte in dreidimensionaler Pelletkultur unter dem Einfluss chondrogener Stimuli. Bis zum 21. Tag nach Induktion zeigte sich eine deutliche Zunahme der chondrogenen Differenzierungsmerkmale.

Histologisch wurde mit der HE, Alzianblau und der Alzianblau-PAS Färbung neben der Zellmorphologie der Nachweis saurer GAG und neutraler Glykoproteine durchgeführt. In den induzierten Pellets wurde eine deutliche Färbung der extrazellulären Matrix, reich an GAG, vor allem in den Randbereichen der Pellets nachgewiesen. In den Randbereichen fand sich eine typische Morphologie von runden, kleinen Chondrozyten und Lakunen, während hingegen im Zentrum vor allem runde Zellen mit größeren Zellkernen und weniger extrazellulärer Matrix zu finden waren. In der Kontrollgruppe war eine Differenzierung innerhalb der Pellets nicht detektierbar, zudem war die Färbung deutlich schwächer ausgeprägt. Makroskopisch waren die Pellets der Kontrollgruppe deutlich kleiner und fragiler.

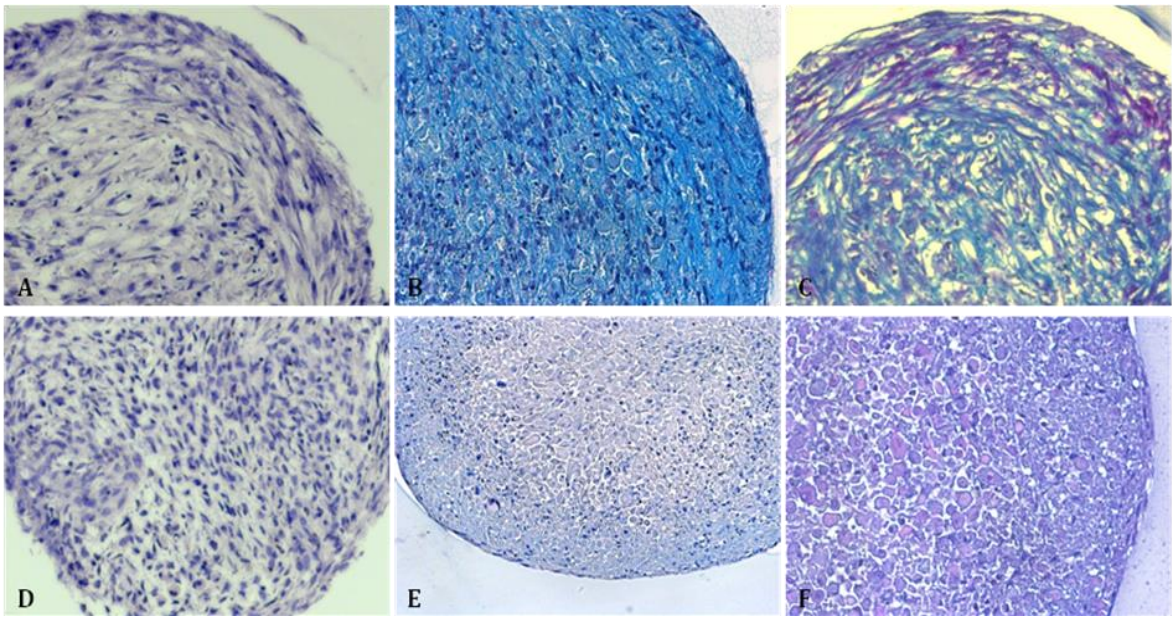


Abb. 26: Chondrogene Differenzierung von hSGSC in der Histologie. Darstellung der chondrogenen Differenzierung und Kontrolle an Tag 14 (20x) in der HE (A,D), Alzianblau (B,E) und der Alzianblau-PAS Färbung (C,F). In den induzierten Pellets (A-C) war die Produktion von EZM in allen drei Färbungen erkennbar und die Zellen hatten eine spindelförmige Form in der an EZM reichen Peripherie und eine aktive, kugelige Form im Zentrum. Die EZM war reich an GAG und Glykoproteinen. In der Kontrolle waren die Pellets einheitlich gefärbt ohne Strukturen der EZM und ohne Differenzierung in der Zellmorphologie (D-F). EZM= Extrazelluläre Matrix; GAG= Glykosaminoglykane; HE= Hämatoxilin Eosin; hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; PAS= Periodic acid Schiff reaction; 20x= 20fache Objektivvergrößerung.

Mittels spezifischer immunhistochemischer Nachweismethoden konnte die Aggrekan Synthese ab Tag 14 als knorpelspezifischer Marker in den differenzierten Pel-

lets nachgewiesen werden. Am stärksten war die Färbung erneut in den Randbereichen, die Kontrollen und Isotypen waren negativ.

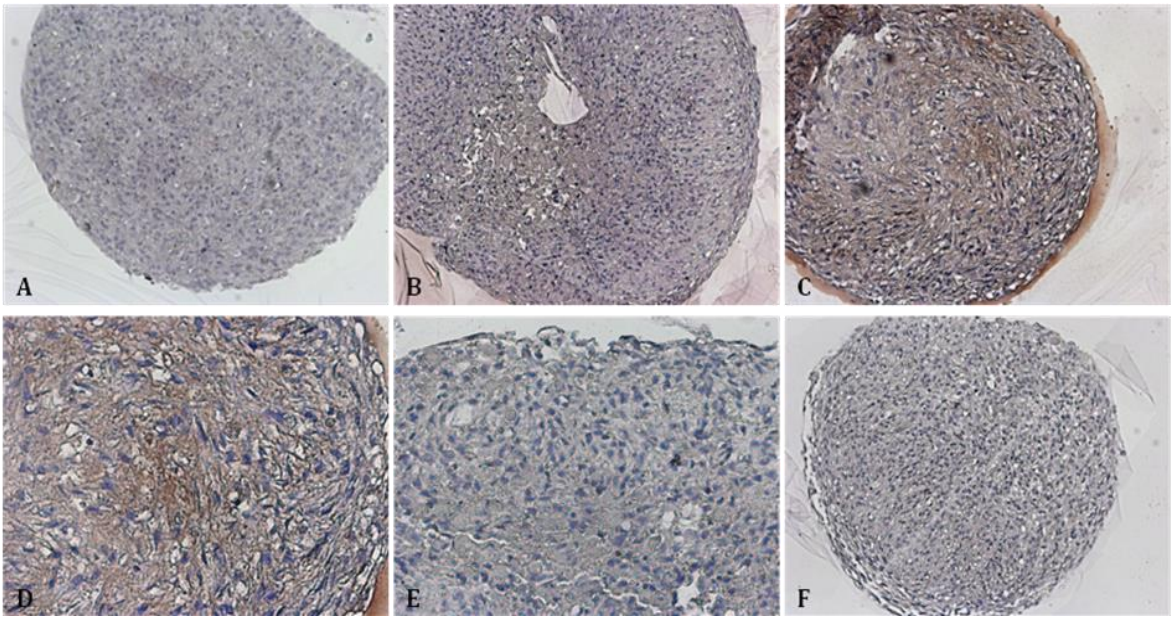


Abb. 27: Chondrogene Differenzierung von hSGSC in der Immunhistochemie, Teil 1. Darstellung der chondrogenen Induktion mit einer Aggrekan Färbung. Zwischen dem 7. (A), 14. (B) und 21. Tag (C) war eine deutliche Zunahme der Färbeintensität zu beobachten im Sinne einer vermehrten Produktion von EZM (A-C, 10x). In stärkerer Vergrößerung erkannte man sowohl spindelförmige Zellen als auch sphärische Zellen, eingebettet in EZM (D, 20x). In der Kontrolle blieb die Produktion von Aggrekan aus (E, 20x), die Isotypenkontrolle war ebenfalls negativ (F, 10x). EZM= Extrazelluläre Matrix; hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

Immunhistochemisch gelang der spezifische Nachweis von Kollagen Typ I und II in den chondrogen differenzierten Pellets. Hierbei ist zu erwähnen, dass nicht in allen differenzierten Pellets Kollagen Typ II nachgewiesen werden konnte, sondern in etwa der Hälfte der untersuchten Fälle.

Die vergleichende, chondrogene Differenzierung von hBMSC zeigte ähnliche Ergebnisse in der Histologie und Immunhistochemie und einen eindeutigen Nachweis von Kollagen Typ II in den differenzierten Pellets.

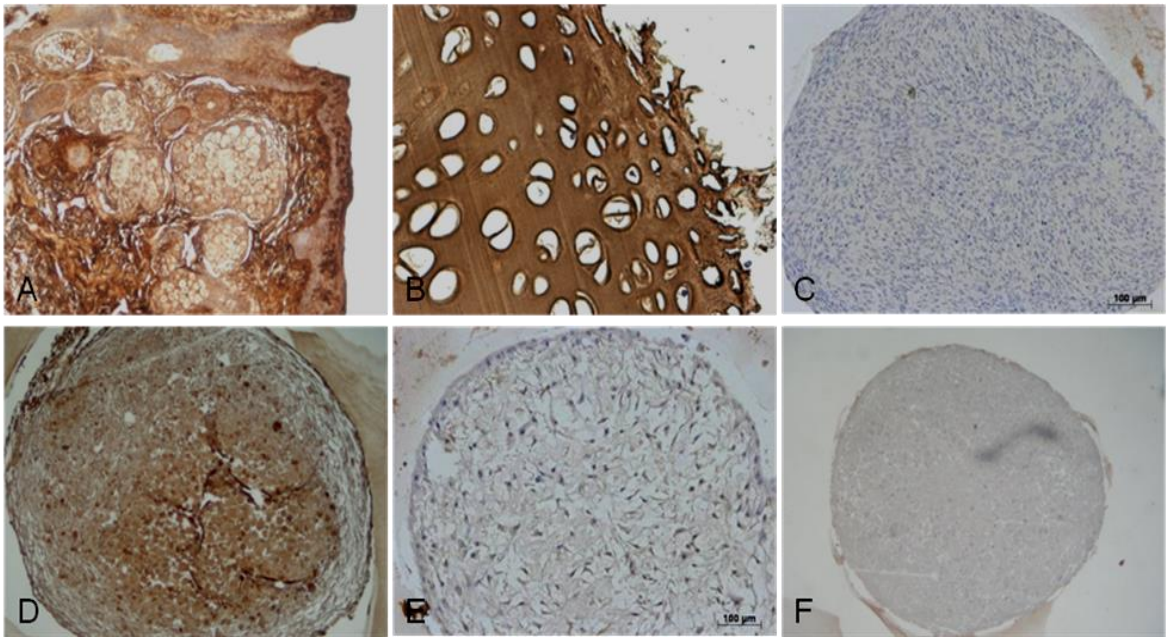


Abb. 28: Chondrogene Differenzierung von hSGSC in der Immunhistochemie, Teil 2. Darstellung der chondrogenen Induktion mit einer Kollagen Typ I und II Färbung an Tag 14 (10x). In der Haut als Positivkontrolle (A) sowie in den induzierten Pellets (D) lies sich Kollagen Typ I nachweisen, in den Pellets der Kontrollgruppe war kein Kollagen Typ I nachzuweisen (F). Ebenso gelang der Nachweis von Kollagen Typ II in hyalinem Knorpel als Positivkontrolle (B) sowie schwach in den induzierten Pellets (E), jedoch nicht in den Pellets der Kontrollgruppe (C). hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

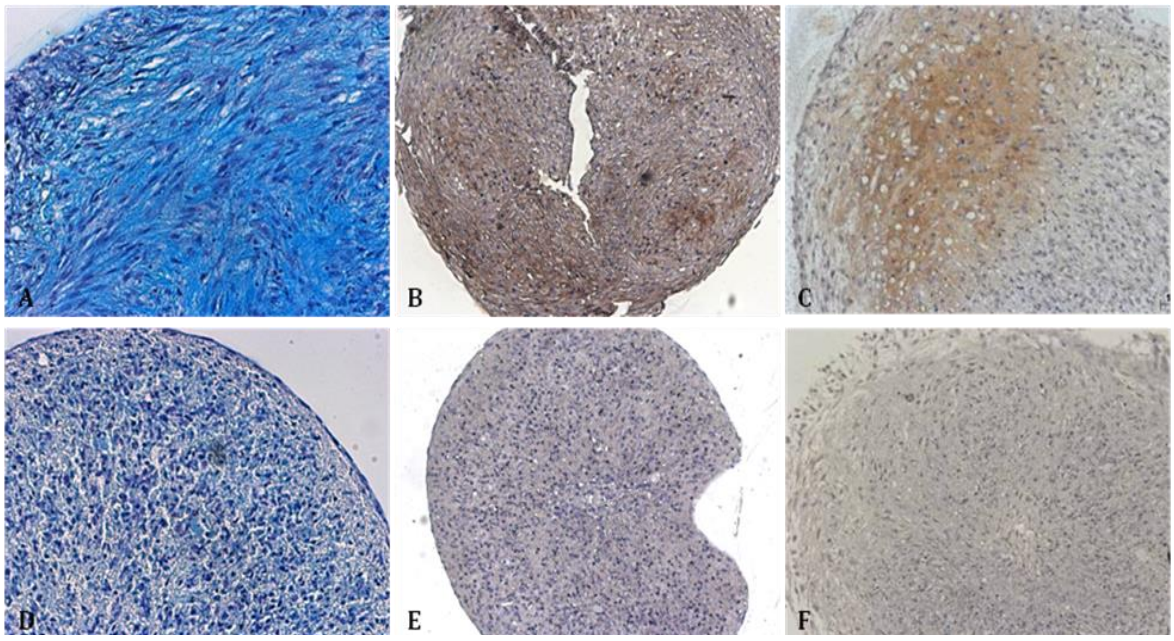


Abb. 29: Chondrogene Differenzierung von hBMSC. Histologische und immunhistochemische Darstellung der chondrogenen Differenzierung und Kontrolle von hBMSC an Tag 14. In den induzierten Pellets Nachweis von EZM in Alzianblaufärbung (A=20x) sowie von Aggrekan (B=10x) und deutlich von Kollagen Typ II (C=20x). In den Pellets der Kontrollgruppe kein Nachweis von EZM in der Alzianblaufärbung (D=10x) sowie kein Nachweis von Aggrekan (E=10x) und Kollagen Typ II (F=10) in der Immunhistochemie. EZM= extrazelluläre Matrix; hBMSC= human Bone Marrow Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergößerung etc.

3.3.3 Osteogene Differenzierung

Die Differenzierung der hSGSC in osteogene Zellen erfolgte in Monolayer-Zellkultur unter dem Einfluss osteogener Stimuli. Die Inkubation erfolgte über 21 Tage, die Analyse der erfolgten Differenzierung erfolgte nach sieben, 14 und 21 Tagen.

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde die Färbung gegen Alkalische Phophatase durchgeführt, welche das auf der Oberfläche der Osteoblasten lokalisierte und für die Verkalkung der Matrix essenzielle Enzym anfärbt.

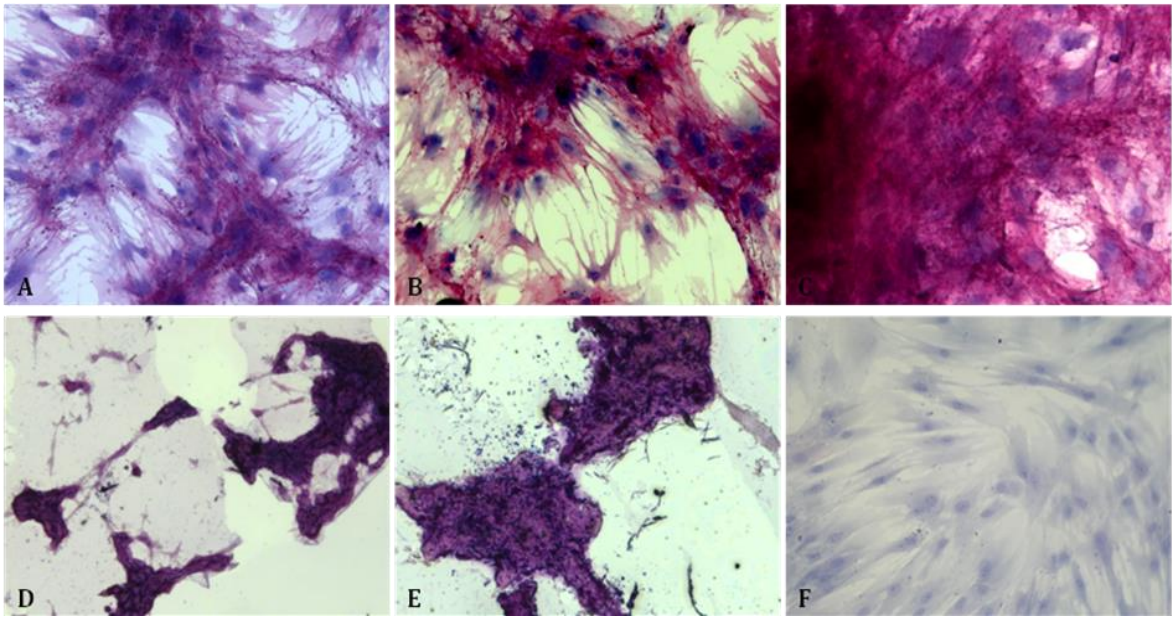


Abb. 30: Osteogene Differenzierung von hSGSC in der Histologie. Die Zellkerne sind blau dargestellt, Zellbestandteile positiv für Alkalische Phosphatase sind rot dargestellt. Von Tag 7 (A, 20x) über Tag 14 (B, 20x) bis Tag 21 (C,40x) war eine deutliche Zunahme der Farbintensität zu beobachten. Nach 21 Tagen war das Material aufgrund eines dreidimensionalen Zellwachstums auch makroskopisch sichtbar, löste sich jedoch im Verlauf der Färbung teilweise von der Oberfläche ab (D,E, 5x). Die Kontrolle zeigt eine unveränderte hSGSC Morphologie und keine Rotfärbung. hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 5x etc.= 5fache Objektivvergrößerung etc.

Immunhistochemisch gelang der Nachweis von Osteopontin als spezifischem Marker osteogener Differenzierung. Diese Glykoproteine unterstützen in-vivo die Verkalkung der zuvor gebildeten organischen Matrix.

In beiden Färbungen erkannte man eine deutliche Zunahme der Färbeintensität im Zeitverlauf sowie eine Proliferation der Zellen. Nach einer Kultivierungsdauer von mehr als 14 Tagen bildeten sich dreidimensionale Strukturen, welche makroskopisch sichtbar waren.

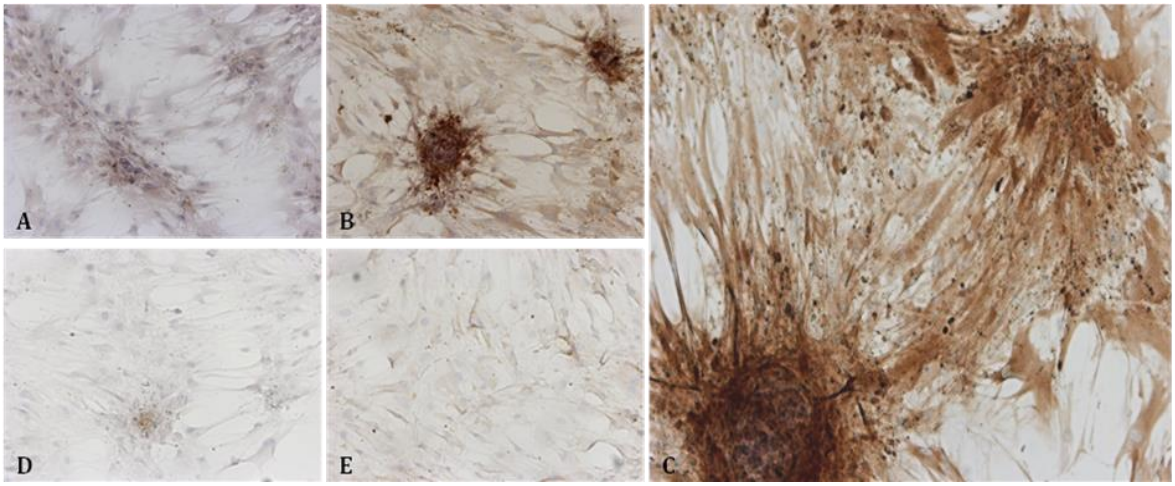


Abb. 31: Osteogene Differenzierung von hSGSC in der Immunhistochemie. Die Zellkerne sind blau dargestellt, Osteopontin ist braun gefärbt. Von Tag 7 (A) über Tag 14 (B) bis Tag 21 (C) war eine deutliche Zunahme der Farbintensität zu beobachten (10x). Die entsprechende Isotypenkontrolle war auch nach 21 Tagen negativ (D,10x). Die nicht differenzierten Zellen zeigten nach 21 Tagen weder eine Braunfärbung noch die für osteogene Differenzierung typische Morphologie (E,10x). hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x= 10fache Objektivvergrößerung.

Im Vergleich zu den hSGSC differenzierten die hBMSC weniger deutlich in osteogenes Gewebe. Die Anordnung der Zellen war ebenso wie die Färbeintensität geringer ausgeprägt.

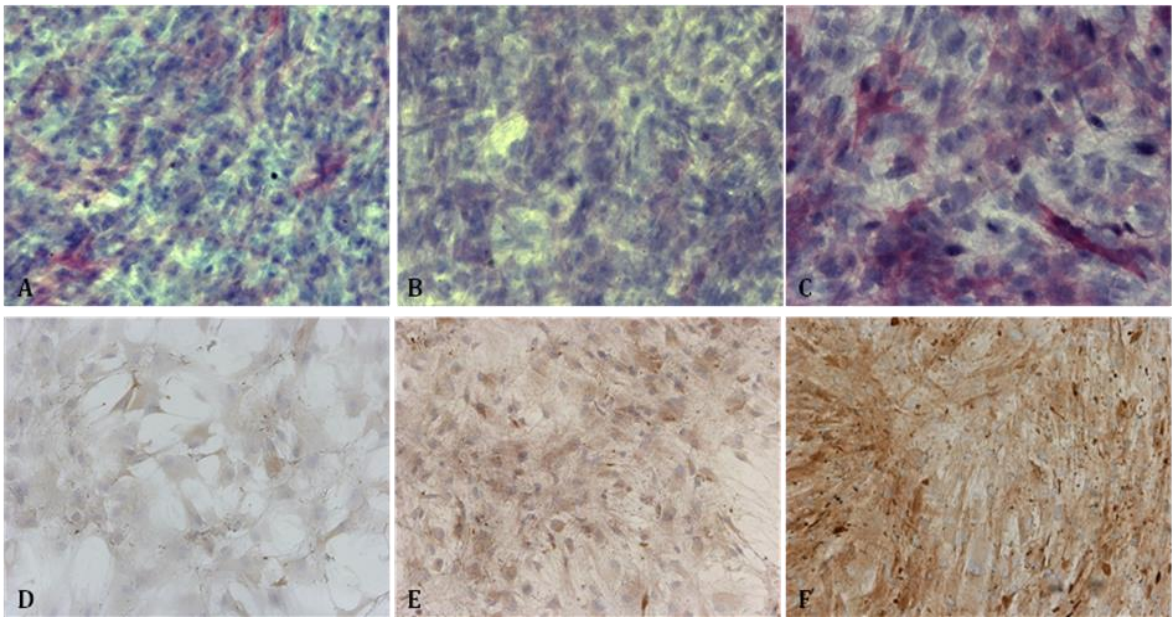


Abb. 32: Osteogene Differenzierung von hBMSC in der Histologie und Immunhistochemie. Histologische (A,B,C) und immunhistochemische (D,E,F) Darstellung der osteogenen Differenzierung. Die Zellkerne sind blau dargestellt, Alkalische Phosphatase rot und Osteopontin ist braun gefärbt. Von Tag 7 (A,D) über Tag 14 (B,E) bis Tag 21 (C,F) war eine deutliche Zunahme der Farbintensität zu beobachten (10x). Die Isotypenkontrolle sowie nicht induzierte Zellen zeigten keine spezifische Färbung (Daten nicht gezeigt). hBMSC= human Bone Marrow Stem cells; 10x= 10fache Objektivvergrößerung.

3.4 Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen

Das weitere Ziel dieser Arbeit war es, humane SGSC in einem dreidimensionalen Zellkultursystem in Azinuszellen zu differenzieren. Es gibt Hinweise, dass diese Differenzierung erfolgreich stattgefunden hat.

Es wurden verschiedene Matrices getestet. Bei allen Matrices zeigte sich, dass bei Kultivierung in einem well einer 24 well Platte das optimale Volumen der Matrix 200µl entsprach. Bei einer Fläche von 1,54cm^2 entspricht dieses Volumen einer Höhe der Matrix von circa 1,5mm.

Die morphologisch besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn primär die Matrix in die well-Platten eingebracht wurde und anschließend die Zugabe der in Medium suspendierten Zellen erfolgte. Eine vorzeitige Durchmischung der Matrix mit der Zellsuspension verschlechterte die morphologische Qualität der Ergebnisse.

Eine Zellzahl von 10^4 Zellen pro well war ideal, um die morphologischen Eigenschaften zu charakterisieren.

Für die Induktionsgruppe wurde das Azinusdifferenzierungsmedium verwendet, welches FGF-2, EGF, Insulin, Dexamethason und Stickstoff Supplement enthielt. Die Kontrolle erfolgte in Azinuskontrollmedium ohne Zusätze.

Die morphologisch besten Ergebnisse zeigten sich bei der Verwendung von Matrigel, so dass der Großteil der Versuche in reinem Matrigel durchgeführt wurde.

3.4.1 Alginat Matrix

Bei der Verwendung von Alginat als Matrix wurden die besten morphologischen Ergebnisse bei einer Alginatkonzentration von 1,3% festgestellt. In der Induktionsgruppe war eine Migration und Aggregation der Zellen zu erkennen, welche in der Kontrollgruppe ausblieb.

Die Versuche mit in Alginat eingekapselten Zellen erbrachten kein zufriedenstellendes Ergebnis, da eine Differenzierung anhand morphologischer Gesichtspunkte weder in der Induktions- noch in der Kontrollgruppe stattfand.

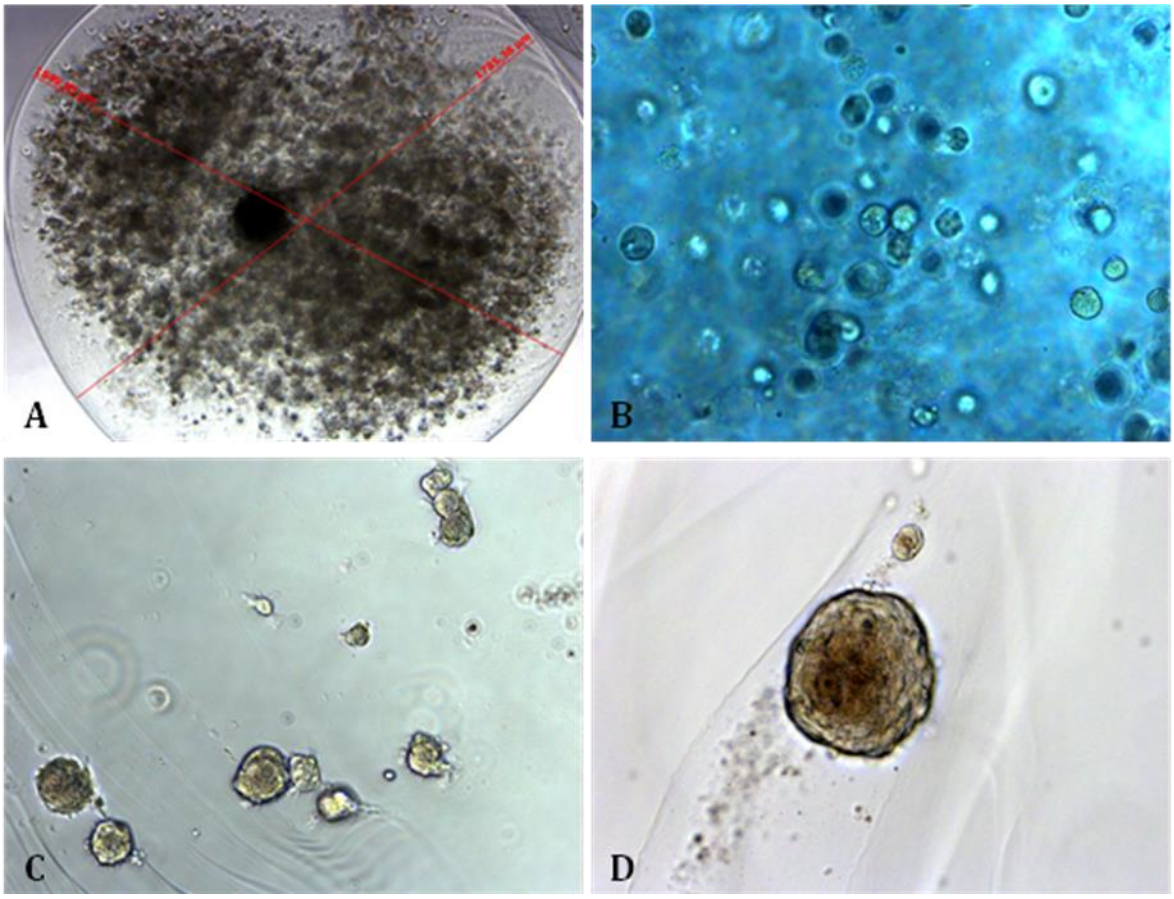


Abb. 33: Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen in einer Alginat Matrix. Bei der Verwendung von etwa 2x2mm großen Beads kam es zu keiner morphologischen Differenzierung der Zellen, sie blieben klein und rund ohne Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (A=5x, B=20x). Auf Alginat Monolayer zeigte sich eine Anordnung der Zellen in kugeligen Aggregaten (C=10x, D=20x). hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

3.4.2 Kollagen Matrix

Ebenfalls als Matrix getestet wurde Kollagen Typ I in verschiedenen Konzentrationen sowie in Mischungen mit Matrigel. Kollagen Typ I zeigte die morphologisch besten Ergebnisse in einer Konzentration von 3,0mg/ml.

Die Zellen zeigten eine Migration und Aggregation in der Induktionsgruppe. Bei den Mischungen mit Matrigel zeigte sich bei zunehmendem Anteil des Matrigels eine zunehmende Migration und Aggregation der Zellen.

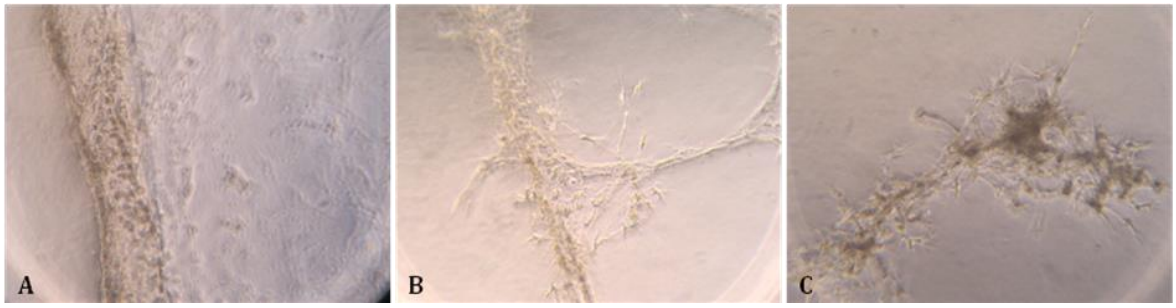


Abb. 34: Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen in Kollagen Typ I / Matrigel Mischung. Je höher der Anteil von Kollagen, desto geringer ausgeprägt erschien die Differenzierung (A=60/40, B=40/60, C=20/80 % Kollagen Typ I / Matrigel) an Tag 4 nach Inkubation (10x). hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x= 10fache Objektivvergrößerung.

3.4.3 Matrigel Matrix

Nach Inkubation der Zellen in der Matrix kam es unter Verwendung des Differenzierungsmediums innerhalb der ersten 24 Stunden zu einer Migration und Anordnung der Zellen. Diese initial noch sehr primitiv erscheinende Anordnung fand in der Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt in vergleichbarem Ausmaß statt. Bei einer Zellzahl von 10^4 Zellen pro well hat sich die Morphologie im Zeitverlauf immer mehr in runde, dreidimensionale, teilweise tubulär erscheinende Aggregate gewandelt. Auf morphologischer Ebene konnte nicht klar differenziert werden, ob es sich bei den entstehenden Aggregaten um azinusähnliche Strukturen im Sinne seröser oder muköser Endstücke mit einem Lumen handelte, oder um tubulärduktale Strukturen, analog dem System der Ausführungsgänge einer exokrinen Speicheldrüse.

Es zeigte sich, dass sowohl der Einfluss der im Differenzierungsmedium vorhandenen Faktoren als auch die dreidimensionale und mit Wachstumsfaktoren versehene Matrix essenziell für die beobachtete Differenzierung waren. Eine Monolayer Kultivierung auf Polystyroloberflächen in Differenzierungsmedium zeigte ebenso wenig die charakteristische Morphologie einer erfolgten Differenzierung wie die alleinige Kultivierung der Zellen in Matrigel ohne den Einfluss der Faktoren im Differenzierungsmedium.

Die morphologisch besten Ergebnisse zeigten sich bei der Verwendung von Matrigel in einer Konzentration von 7,5mg/ml.

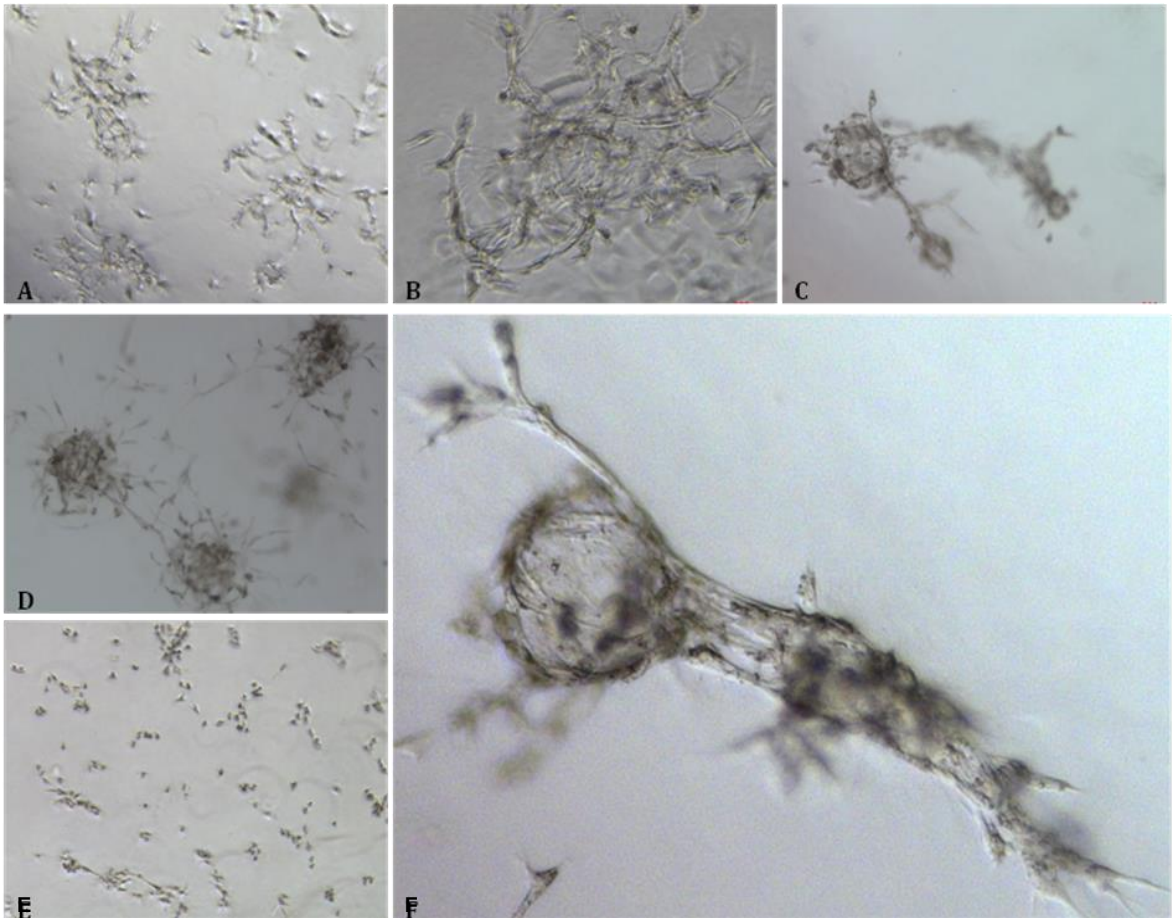


Abb. 35: Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen in Matrigel im Phasenkontrastmikroskop (Zellzahl 1x10^4 pro well). Es zeigte sich eine Migration und Anordnung der Zellen in tubulären und azinusähnlichen Strukturen zwischen Tag 4 und Tag 21 (A=d4, B=d7, C=d14, D=d21, 10x). In der Kontrollgruppe blieb diese Anordnung aus (E). Bei stärkerer Vergrößerung (20x) erkannte man azinusähnliche und tubuläre Strukturen im Sinne eines Endstückes mit angeschlossenem Gangsystem (F). d= Tag; hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

Es war nicht möglich, diese mikroskopisch kleinen Strukturen im Matrigel zu isolieren und zu fixieren, um so eine detaillierte Darstellung mittels Histologie und Immunhistochemie zu ermöglichen. Bei Fixierung der Mischung aus Matrigel und Zellen innerhalb der Wellplatten mit verschiedenen Fixiermethoden und Mischungen aus Formalin, Aceton und Methanol kam es zur Auflösung der Strukturen. Nach einem Verdau des Matrigel mit MG Cell Recovery Solution gingen im Rahmen der nötigen Wasch- und Zentrifugationsschritte so viele Zellen verloren, dass ein Nachweis der Strukturen im Paraffinblock nicht mehr möglich war. Daher wurde die Zellzahl pro well verzehnfacht. Hierdurch entstanden in der Induktionsgruppe größere, bereits makroskopisch sichtbare Aggregate von Zellen, die nach Verdau des Matrigel oder nach dessen mechanischer Zerkleinerung entnommen, fi-

xiert und histologisch aufbereitet werden konnten. Dabei ging jedoch ein Teil der bei geringer Zellzahl vermuteten azinusähnlichen und tubulären Strukturen wieder verloren. In der Kontrollgruppe war diese Anordnung nicht zu beobachten.

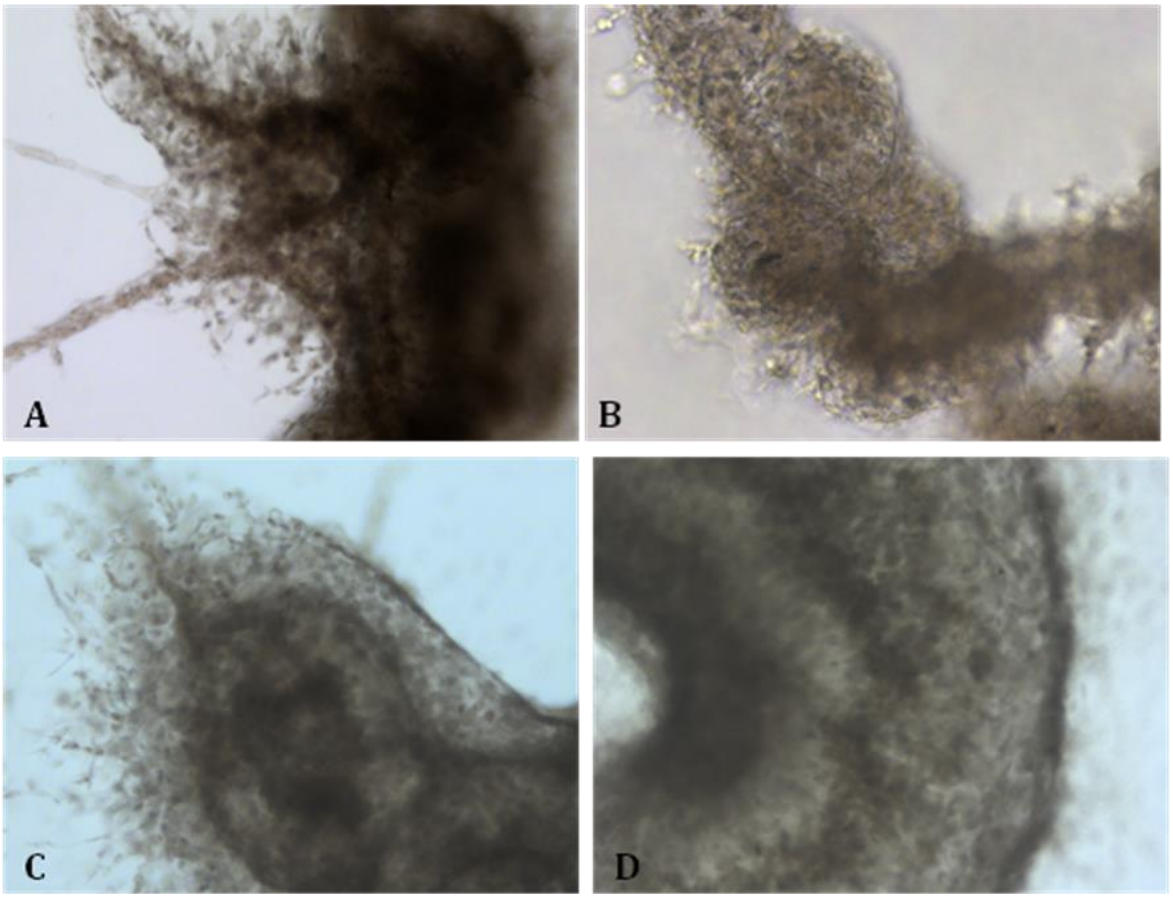


Abb. 36: Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen in Matrigel im Phasenkontrastmikroskop (Zellzahl 1x10^5 pro well). Bei Erhöhung der Zellzahl zeigte sich die Bildung großer Aggregate, wobei bis zum 21. Tag die Ähnlichkeit zu Azinusstrukturen nicht mehr erkennbar war. (A=d4, B=d7, C=d14, D=d21, 10x). d= Tag; hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x= 10fache Objektivvergrößerung.

Vergleichend wurden hBMSC in Azinuszellen differenziert. Hierbei zeigte sich rein morphologisch kein relevanter Unterschied zu den verwendeten hSGSC. In der Induktionsgruppe war eine Anordnung der Zellen ab Tag drei detektierbar, die Kontrollgruppe zeigte über die gesamte Beobachtungsdauer keine vergleichbare morphologische Anordnung der Zellen.



Abb. 37: Differenzierung von hBMSC in Azinuszellen in Matrigel im Phasenkontrastmikroskop. In Bild A und B (5x) erkannte man die bereits beschriebene azinusähnliche Anordnung der Zellen im Matrigel nach drei bzw. sieben Tagen. In der Kontrolluntersuchung (C, 10x) blieb diese Anordnung aus. hBMSC= human Bone Marrow Stem cells; 5x etc.= 5fache Objektivvergrößerung etc.

Durch die Erhöhung der Zellzahl gelang es, einen Teil der größeren und stabilen Aggregate in HistoGel zu fixieren. Histologisch zeigte sich ein sehr gemischtes Bild aus Zellen, extrazellulärer Matrix und Matrigel Bestandteilen. Erkennbar waren runde Strukturen mit einem Lumen im Sinne von Azinusstrukturen bzw. serösen oder mukösen Endstücken. Da sich das Matrigel ebenfalls PAS positiv darstellte, war nicht sicher zu differenzieren, ob die Zellen PAS positiv waren oder nicht.

Bei Kultivierung der Zellen in Matrigel mit Kontrollmedium bildeten sich keine zusammenhängenden Strukturen, so dass diese weder histologisch noch immunhistochemisch dargestellt werden konnten.

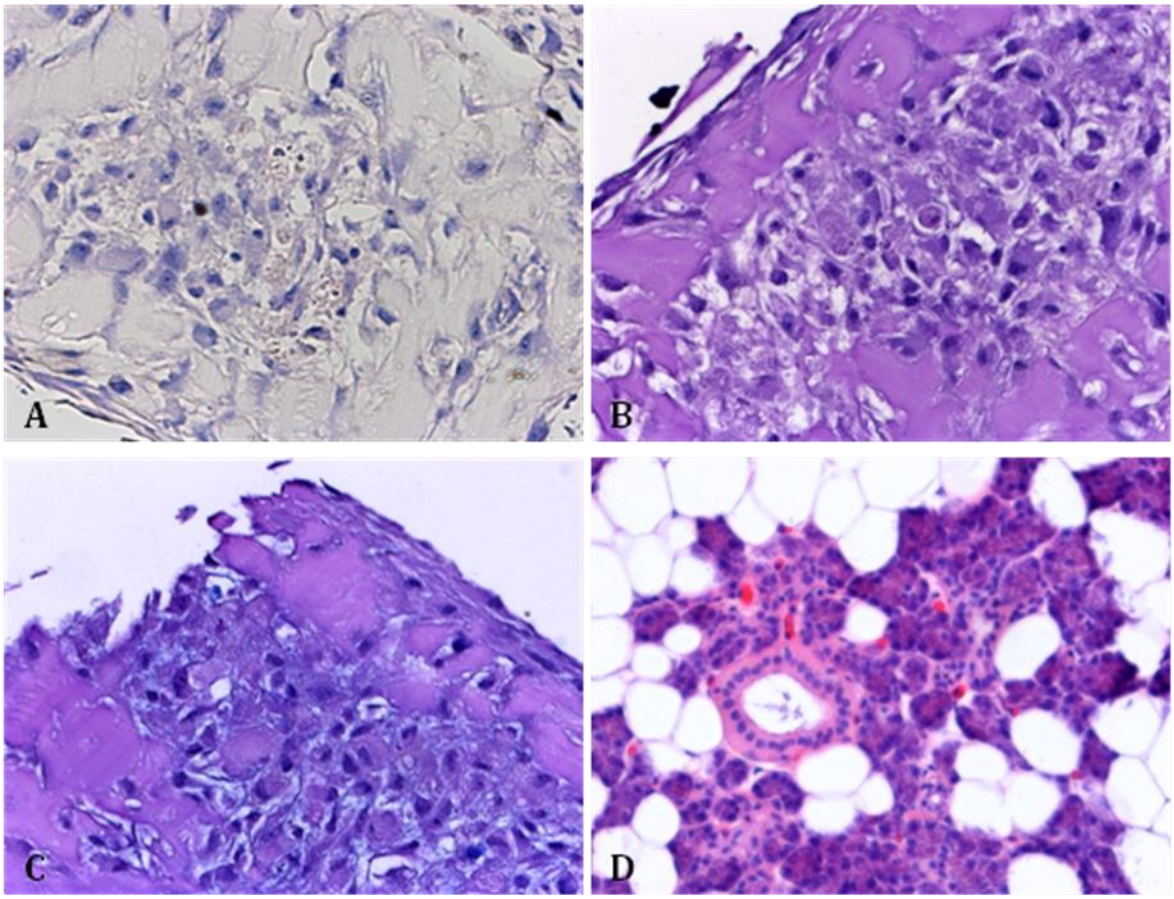


Abb. 38: Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen in Matrigel in der Histologie. Darstellung nach 4-tägiger Inkubation im Differenzierungsmedium (20x). In der HE Färbung stellten sich die Zellkerne blau dar (A), in der PAS Färbung wurden Mukopolysaccharide violett dargestellt (B). In der Alzianblau-PAS Färbung zeigten sich die sauren Glykoproteine zusätzlich blau (C). Zum Vergleich ein Schnitt aus der humanen Parotis in der PAS Färbung (D). HE= Hämatoxilin Eosin; hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; PAS= Periodic acid Schiff reaction; 20x= 20fache Objektivvergrößerung.

Immunhistochemisch wurden die differenzierten Zellen auf die Expression verschiedener Antigene hin untersucht. Als Nachweis einer spezifischen Bindung diente neben der Isotypenkontrolle die Verwendung von gesundem Speicheldrüsengewebe als Positivkontrolle.

Die duktalen Marker Vimentin und Kallikrein 13 waren selektiv auf den Ausführungsgängen im Drüsengewebe sichtbar. In den in Matrigel differenzierten Zellen zeigte sich ebenfalls ein positives Ergebnis.

Zum Nachweis azinärer Differenzierung wurde ein Antikörper gegen α-Amylase verwendet. Im Parotisgewebe konnte erwartungsgemäß α-Amylase intraluminal nachgewiesen werden. Die differenzierten Zellen zeigten nur vereinzelt eine Aktivität von α-Amylase.

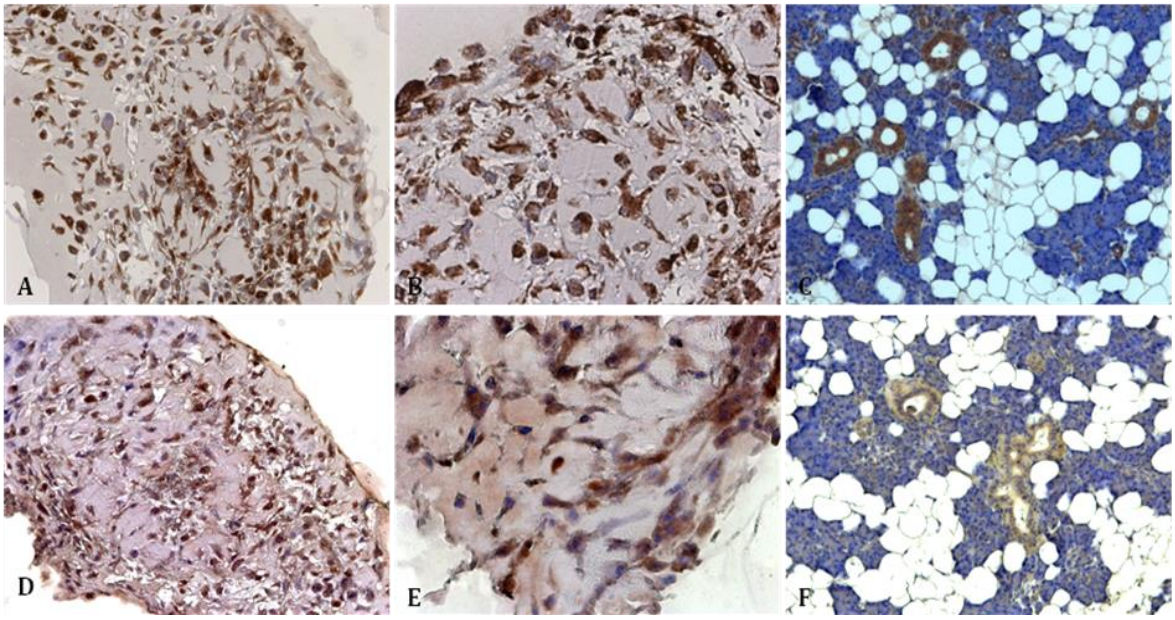


Abb. 39: Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen in Matrigel in der Immunhistochemie, Teil I. Dargestellt ist die Expression der duktalen Marker Vimentin (A-C) und Kallikrein 13 (D-F). Die in Matrigel differenzierten Zellen waren für beide Marker eindeutig positiv (A,D; 10x). In stärkerer Vergrößerung war auch eine Anordnung der Zellen zu erkennen (B,E; 20x). In gesundem Parotisgewebe zeigten die Ausführungsgänge wie zu erwarten eine Expression beider Antigene (C,F=10x). hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

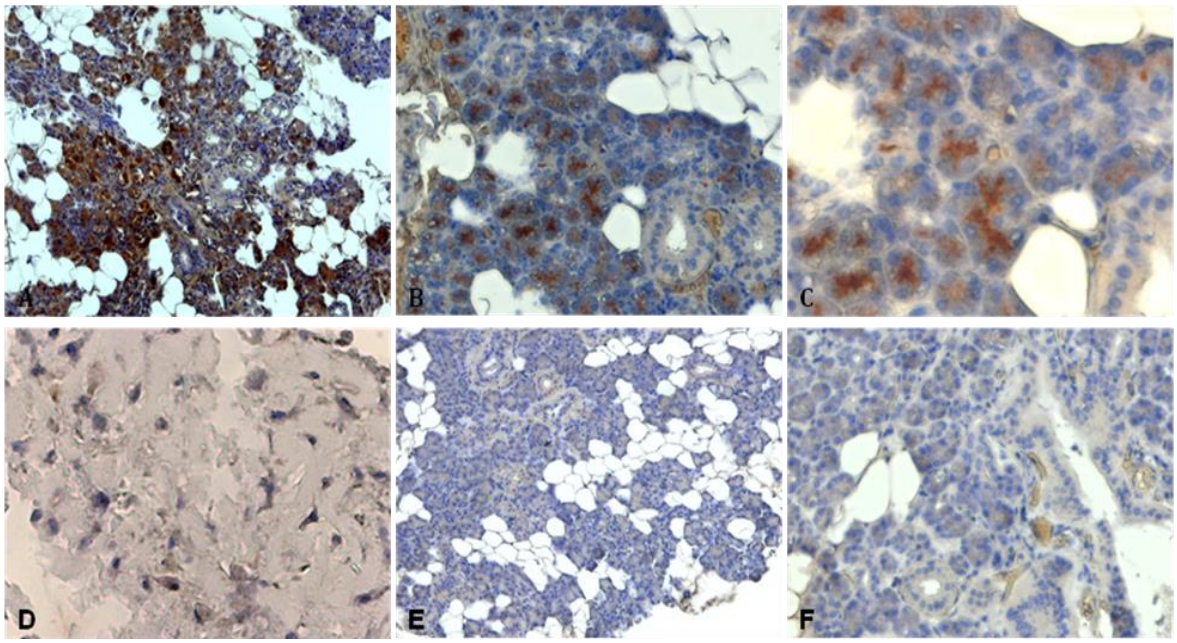


Abb. 40: Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen in Matrigel in der Immunhistochemie, Teil II. Dargestellt ist die Expression von α-Amylase und der entsprechenden Isotype. Im Parotisgewebe als Positivkontrolle zeigte sich eine eindeutige Expression von α-Amylase (A=5x, B=20x, C=40x). In den differenzierten Zellen zeigte sich eine sehr schwache Expression einzelner Zellen (D=20x). In der Isotypenfärbung zeigte sich im Parotisgewebe keine Färbung (E=10x, F=20x). hSGSC= human Salivary Gland Stem cells; 10x etc.= 10fache Objektivvergrößerung etc.

3.5 Gewebebank für RNA-Isolation

Im Rahmen der erfolgten Zellkulturexperimente zur Charakterisierung und Differenzierung von hSGSC wurde ein Teil des Probenmaterials dafür verwendet, Zellen für eine Genexpressionsanalyse mittels real-time PCR zu generieren. Insgesamt fünf nicht differenzierte Zellreihen wurden regelmäßig in den Passagen drei, sechs, neun und zwölf dafür verwendet, ein Zelllysat herzustellen, um damit die Möglichkeit zur RNA-Isolation und weiteren Genexpressionsanalysen zu haben. Somit können Stammzellmarker quantitativ im Zeitverlauf untersucht werden. Die Zelllysate sind tiefgefroren und stehen für eine RNA-Isolation zur Verfügung.

In Monolayer Kultur adipogen und osteogen differenzierte Zellen wurden ebenfalls für die Gewinnung von Zelllysaten zur späteren RNA-Exraktion verwendet. Von fünf Fällen in verschiedenen Passagen stehen Proben nach Tag sieben, 14 und 21 Tagen zur Genexpressionsanalyse zur Verfügung. Quantitativ mittels real-time PCR analysiert werden kann das für adipogene Differenzierung spezifische Protein PPAR-γ oder das für die osteogenen Differenzierung spezifische Protein Osteopontin.

Chondrogen differenzierte Pellets wurden in Lysing Matrix Tubes in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Pellets von fünf chondrogen differenzierten Kulturen nach sieben, 14 und 21 sind tiefgefroren in Lysing Matrix Tubes. Von Interesse ist die Expression chondrogener Marker wie Kollagen Typ I und II sowie von Aggrekan.

Ebenfalls wurde Material gewonnen, um die Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen auf RNA Ebene nachzuweisen. Hierfür stehen Proben mit tiefgefrorenen Zelllysaten als auch komplette Azinusaggregate in Lysing Matrix Tubes zur Verfügung. Erste Stichproben haben bereits gezeigt, dass aus dem gewonnenen Probenmaterial ausreichend RNA für eine real-time PCR Analyse extrahiert werden kann. Anschließend können die spezifischen Marker der Azinusdifferenzierung Vimentin, Kallikrein 13, und α-Amylase untersucht werden. Die real-time PCR wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von hSGSC

Der Ursprung der modernen Stammzelltherapie geht zurück in die fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts, als entdeckt wurde, dass nach intravenöser Verabreichung von Knochenmarkzellen ein zuvor durch Bestrahlung knochenmarkdepletiertes Versuchstier neue Blutzellen produzierte [89]. 1987 wurde durch die gleiche Arbeitsgruppe erstmals ein an Leukämie erkrankter Patient erfolgreich mit Knochenmark transplantiert; Edward Donall Thomas erhielt dafür 1990 den Nobelpreis für Medizin. Heute ist die Transplantation von HSC ein etabliertes Verfahren zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen insbesondere des Knochenmarks. Das Differenzierungspotenzial der HSC ist allerdings auf hämatopoetische Zellen beschränkt [90].

Einige Zeit galten embryonale Stammzellen aufgrund ihres totipotenten Differenzierungsverhaltens als künftige Perspektive in der Heilung degenerativer und genetisch determinierter Erkrankungen. Neben der ethisch umstrittenen Verwendung dieser Zellen sind die Probleme der Immunkompatibilität sowie der spontanen Differenzierung und Entartung bislang nicht endgültig gelöst und schränken daher den Gebrauch dieser Zellen ein [91].

Friedenstein et al entdeckte im Jahr 1970 Stammzellen im adulten Knochenmark, die in-vitro kultiviert werden konnten und adhärent auf Zellkulturoberflächen wuchsen, wodurch sie sich von den HSC unterschieden. Aufgrund der Morphologie wurden diese Zellen anfangs als colony-forming unit fibroblasts beschrieben [28]. Das in-vitro Differenzierungspotenzial dieser Zellen galt lange Zeit als multipotent und beschränkte sich somit auf Gewebe, welches aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm bzw. dem Mesenchym, dem embryonalen Grundgewebe stammte. Daher wurden diese Zellen auch als MSC bezeichnet.

MSC gelten heute aufgrund ihrer leichten und ethisch unbedenklichen Zugänglichkeit als vielversprechende zelluläre Ressource für regenerative Ansätze der Stammzelltherapie und des Tissue Engineering. Da MSC keine MHC Moleküle

exprimieren, wirken sie nicht immunogen und führen nicht zu Abstoßungsreaktionen [85]. Darüber hinaus können MSC autolog verwendet werden.

Es gibt zahlreiche Arbeiten über die Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus verschiedenen Organen [8,12,30,40,45,46,48,75,109].

Erste Hinweise auf die Existenz von multipotenten Progenitorzellen in Speicheldrüsen gab es durch Tierexperimente, in denen ein Teil der Speicheldrüse operativ entfernt oder der Ausführungsgang ligiert wurde. Dadurch kam es zur Atrophie und Fibrose der Azinuszellen, während eine Proliferation der periduktalen Zellen beobachtet werden konnte. Nach Entfernen der Ligatur nach sieben Tagen kam es zur Regeneration der Azini durch Zellen aus den Streifenstücken des duktalen Systems [15,87,88]. Durch Versuche mit Thymidin markierten Zellen konnten die Schaltstücke der Ausführungsgänge als wahrscheinlicher Sitz der Progenitorzellen identifiziert werden [54].

Die Isolation und Charakterisierung von Vorläuferzellen in Speicheldrüsen erfolgte 2003 aus Mäusen. Durch mechanische Zerkleinerung und enzymatischen Verdau konnten Vorläuferzellen isoliert werden. Diese zeigten die Fähigkeit zur Selbsterneuerung ebenso wie ein typisches Expressionsmuster von Oberflächenantigenen und Differenzierungspotenzial [34,59].

Im Jahr 2008 gelang es erstmals, humane MSC aus Speicheldrüsen zu isolieren. Durch ein Isolationsprotokoll ähnlich den tierischen Versuchen gelang es, im Rahmen einseitiger Parotidektomien hSGSC zu isolieren [70].

Die Mindestanforderungen an MSC und somit an hSGSC sind definiert durch in-vitro Proliferationsfähigkeit, Plastikadhärenz, Differenzierung in mesenchymale Grundgewebe und charakteristische Expression von Oberflächenantigenen [24].

4.1.1 Wachstumspotenzial der hSGSC

Die Isolation und Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte auf Grund eben dieser Eigenschaft der Plastikadhärenz. Nicht adhärente Zellen wie hämatopoetische Zellen wurden durch die zahlreichen Medienwechsel und Passagierungen der Zellen entfernt. Im Gegensatz zu Fibroblasten oder endothelialen Zellen zeigen adulte Stammzellen in-vitro ein über viele Passagen hohes Proliferationspotenzial. Die Kultivierung der hSGSC erfolgte über insgesamt 17 Passagen

und war vergleichbar mit dem Wachstumsverhalten von hBMSC und anderen MSC. Die Abnahme der Proliferationskapazität mit zunehmender Kultvierungsdauer ist erklärt durch Prozesse der zellulären in-vitro Seneszenz und kann auf eine Verkürzung der Telomerlänge zurückzuführen sein [31]. Die Morphologie der langen, bipolaren, spindelförmigen Zellen während der Kultivierung entsprach den Berichten über MSC aus anderen Ursprungsorganen [21]. In zukünftigen Arbeiten ist es geplant, diese Prozesse der zellulären in in-vitro Seneszenz, welche zu der beobachteten Abnahme der Proliferationskapazität im Zeitverlauf führten, durch FISH Untersuchungen der Telomerlänge darzustellen.

4.1.2 Differenzierungspotenzial der hSGSC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hSGSC in die mesenchymalen Grundgewebe Fett, Knorpel und Knochen differenziert, um ihr multipotentes Differenzierungspotenzial zu untersuchen. Vergleichend wurden hBMSC differenziert.

Der Nachweis der Differenzierung erfolgte histologisch/morphologisch sowie immunhistochemisch durch den qualitativen Nachweis spezifischer Marker. Künftig können die Ergebnisse noch durch eine Untersuchung der Genexpression des vorliegenden Materials ergänzt werden; hierdurch ist auch eine Quantifizierung der einzelnen Marker möglich.

Insgesamt war das Differenzierungsverhalten von hSGSC mit hBMSC und MSC anderer Ursprungsgewebe vergleichbar [62].

Es zeigte sich jedoch eine unterschiedliche Ausprägung der osteogenen bzw. adipogenen Differenzierung bei hSGSC und hBMSC. Es wurde beobachtet, dass morphologisch in der Histologie und Immunhistochemie hBMSC besser adipogen als osteogen differenzierten, während hingegen hSGSC eine stärkere Ausprägung der osteogenen Differenzierung zeigten. Osteogene und adipogene Differenzierung beruhen in-vivo auf den gleichen Progenitorzellen, es besteht allerdings eine inverse Regulation von Osteogenese und Adipogenese durch MAP Kinasen. Bei Aktivierung der MAP Kinase ERK resultiert eine osteogene Differenzierung, eine Inhibition resultiert in adipogener Differenzierung [37]. Inwiefern dies die unterschiedliche Ausprägung der adipogenen bzw. osteogenen Differenzierung zwischen hSGSC und hBMSC erklärt, ist noch unklar, ist aber ein möglicher Ansatz für zukünftige Experimente.

Bei der chondrogenen Differenzierung von hSGSC gelang neben dem histologischen Nachweis der Produktion von EZM der immunhistochemische Nachweis von Aggrekan als spezifischem Marker chondrogener Differenzierung. Ebenso konnte die Produktion von Kollagen Typ I und Typ II nachgewiesen werden. Der Nachweis von Kollagen Typ II war schwach ausgeprägt und in etwa der Hälfte der Fälle möglich, Kollagen Typ I konnte regelmäßig nachgewiesen werden. Dieser unvollständige Nachweis von Kollagen Typ II liegt möglicherweise an der begrenzten Kulturdauer von maximal 21 Tagen. Spätere Untersuchungszeitpunkte für den Nachweis von Kollagen Typ II sind somit erforderlich.

hBMSC zeigten vergleichbare Ergebnisse in der chondrogenen Differenzierung bei einer insgesamt leicht stärkeren Produktion von Kollagen Typ II.

4.1.3 Immunphänotyp der hSGSC

Gemäß den Anforderungen der International Society for Cellular Therapies spielt der Immunphänotyp eine entscheidende Rolle bei der Definition von Zellen als MSC [24]. Es wird in der Literatur kein einheitliches Vorgehen angegeben, ab welchem Zeitpunkt von einer positiven Expression eines Markers auszugehen ist. Die durchflusszytometrische Analyse bietet durch verschiedene Analyseverfahren und Einstellungsoptionen eine große Bandbreite an Interpretationen. In dieser Arbeit wurde kein definitiver Grenzwert für eine bestimmte Darstellung festgelegt, vielmehr wurde versucht, durch die Kombination der Methoden Dot-Blot Analyse, Histogramm Analyse und Median Analyse der biologischen Realität möglichst nahe zu kommen.

Zu den positiven Oberflächenmarkern gehören gemäß der Definition der International Society for Cellular Therapy CD73, CD90 und CD105 [24].

CD73 ist auch als Ekto 5´Nucleotidase bekannt. CD90 ist auch als Thy-1 bekannt, und CD105, auch als Endoglin und SH2 Domäne benannt, sind anerkannte Oberflächenmarker von MSC [9,55,58,62,95,104].

Die in dieser Arbeit isolierten hSGSC exprimierten in Passage drei zu mehr als 95% CD73 und CD105; CD90 wurde mit 86,70% etwas schwächer exprimiert.

Des Weiteren wurden die Antigene CD29 und CD44 von über 99% der hSGSC in dieser Arbeit exprimiert. CD 29 ist ein Beta-1 Integrin, welches zusammen mit Al-

pha-2 Integrin ein Heterodimer bildet und eine wichtige Funktion bei zellulärer Adhäsion und Interaktion spielt. CD44, ein multifunktionales zelluläres Adhäsionsprotein, auch Homing Cell Adhesion Molecule genannt, ist unter anderem ein Selektin Ligand und spielt eine große Rolle beim Homing hämatopoetischer und mesenchymaler Stammzellen im Knochenmark. Sowohl CD29 [47,55,104] als auch CD 44 [55,62,71,104] sind in der Literatur als etablierte MSC-Marker bekannt.

CD54, Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 genannt, wird vorwiegend auf Leukozyten und Endothelzellen exprimiert und erleichtert Leukozyten nach entsprechender Aktivierung die Transmigration ins Gewebe. CD54 scheint auch auf MSC exprimiert zu werden und bei hBMSC eine physiologische Rolle bei Immunfunktion und Hämatopoese zu spielen [19,53,81]. Bei den untersuchten hSGSC wie auch bei den hBMSC exprimierten jeweils ungefähr ein Viertel der Zellen CD54.

Somit exprimierten die in dieser Arbeit untersuchten hSGSC entscheidende Marker in vergleichbarer Quantität und Qualität wie bekannte, bereits charakterisierte MSC [68]. Der initial geringere Anteil CD90 positiver hSGSC lässt sich möglicherweise durch die Herkunft des Gewebes erklären, da die parallel untersuchten hBMSC in mehr als 95% der Fälle eine Expression von CD90 zeigten. Auf die möglichen Differenzen in der Expression von MSC Markern abhängig vom Ursprungsgewebe und weiteren Faktoren wird noch hingewiesen werden.

Als Beispiele für negative Marker wurden die Antigene CD34, CD45 und CD106 gewählt. CD34 ist ein Glykoprotein und bekannt als Marker hämatopoetischer Stammzellen und primitiver Vorläuferzellen der erythroiden, lymphoiden und myeloiden Zellreihe [44]. Darüber hinaus ist CD34 auf Endothelzellen sowie auf der Basalmembran einiger Organe zu finden. MSC sollten per definitionem kein CD34 Antigen exprimieren [24,62,81,95].

CD45, auch bekannt als Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ C, wurde früher auch als Leukozyte Common Antigen bezeichnet und ist auf differenzierten hämatopoetischen Zellen zu finden, wo es eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung an T- und B-Zellrezeptoren spielt. Es ist ein Marker, der bei MSC nicht exprimiert werden sollte [9,62,81,95].

CD106, das Vascular Cell Adhesion Molecule 1, wird insbesondere auf aktivierten Endothelzellen exprimiert und erleichtert hämatopoetischen Zellen die Adhäsion an Endothelzellen und damit die Migration ins Gewebe. hBMSC exprimieren das

CD106 Antigen in unterschiedlicher Intensität [53,55,58,62]. hMSC aus anderen Geweben, wie zum Beispiel aus Fettgewebe, Nabelschnurblut und Pankreas exprimieren kein CD106 Antigen [31,42,109].

In den in dieser Arbeit untersuchten hSGSC wurden weder CD45 noch CD106 exprimiert. Die untersuchten hSGSC waren in 11,4% positiv für das CD34 Antigen. In den untersuchten hBMSC wurde CD34 nicht exprimiert. In der Literatur gibt es Berichte über CD34 positive BMSC, welche aber möglicherweise unter in-vitro Bedingungen das CD34 Antigen wieder verlieren [39,77]. Es scheint wahrscheinlich, dass abhängig von der Herkunft der MSC CD34 von einigen Zellen exprimiert wird; so ist auch bei MSC aus dem Fettgewebe eine CD34 positive Subpopulation beschrieben [19]. Daher kann man auch bei hSGSC von einer CD34 positiven Subpopulation ausgehen.

Diskrepanzen in der Expression von Oberflächenantigenen bei MSC verschiedener Ursprungsorgane sind wie bereits aufgeführt auch in der Literatur vorhanden [19,39,77]. So zeigen auch die hier untersuchten hSGSC eine nicht übliche Expression von CD34 und eine leicht verminderte Expression von CD90. Die sonstigen Marker werden analog zu anderen MSC exprimiert. Als Erklärung für diese Unterschiede gibt es verschiedene Faktoren, die in einer Übersicht von Rojewski et al. zusammengefasst wurden. Einfluss haben neben dem bereits genannten Ursprung der MSC auch das Patientenalter und Geschlecht, die Verarbeitung des Gewebes während der Isolation, die Kultivierungsbedingungen sowie Mechanismen der in-vitro Seneszenz durch Herabregulation und beispielsweise enzymatische Zerstörung der Oberflächenantige [68]. Der letztgenannte Punkt ist insbesondere deswegen entscheidend, da in dieser Arbeit die Analyse der Oberflächenantigene erst in Passage drei stattgefunden hat

Interessant waren die Ergebnisse der weiteren Stammzellmarker. CD117, c-Kit oder auch Stammzellfaktor Rezeptor genannt, ist eine Rezeptor Tyrosinkinase und ein bekanntes Protoonkogen. C-Kit spielt nach Bindung seines Liganden, dem Stammzellfakor, eine wichtige Rolle bei Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen [49]. Auf MSC konnte bislang keine wesentliche Expression von CD117 festgestellt werden [38]. Dennoch wurde auch im Rahmen der Forschung an murinen SGSC gezeigt, dass eine Subpopulation von

weniger als einem Prozent c-Kit positiver Zellen existiert. Diese Zellen scheinen in-vivo ein ausgeprägtes, regeneratives Potenzial zu besitzen [51].

Das CD271 Antigen ist auch bekannt als Nerve Growth Factor Rezeptor. Er gehört zur Familie der Neurotrophin Rezeptoren und zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptoren und war ursprünglich für seine Rolle bei Wachstum, Entwicklung und Differenzierung neuronaler Zellen bekannt. Thomson et al. zeigten, dass CD271 auf Zellen aller drei Keimblätter exprimiert wird [92]. Heute gilt CD271 als vielversprechender Marker für die Selektion einer hochpotenten hBMSC Subpopulation [13,14,65,81]. Die Expression von CD271 auf MSC anderer Ursprungsorgane ist noch nicht abschließend geklärt, scheint aber vorwiegend heterogen oder negativ zu sein [2,6,31].

CD117 und CD271 waren auf 0,96% bzw. 0,90% der untersuchten hSGSC exprimiert. Beachtet man den Fluoreszenzanstieg in der Intensität, ausgedrückt als medianer Fluoreszenzanstieg, so erkennt man ebenfalls ein leicht positives Ergebnis. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Lombaert et al., welche c-Kit positive hSGSC isolierten. Der Prozentsatz c-Kit positiver Zellen lag hier bei initial 0,3% [51].

Eindrücklicher hingegen war die Expression der Marker STRO-1 und MSCA-1. Das monoklonale Antigen W8B2, heute als MSCA-1 bekannt, wurde bereits 2003 als Marker für BMSC beschrieben [100]. Die Expression von MSCA-1 auf BMSC ist heterogen, das bedeutet, nur ein Teil der untersuchten Kulturen exprimiert das Antigen in unterschiedlicher Häufigkeit und Intensität. W8B2 gilt dennoch als neuer Marker für die Isolation einer Stammzellsubpopulation mit erhöhter Proliferationsrate und gesteigertem Differenzierungspotenzial [7,13]. Vor Kurzem wurde MSCA-1 als nicht-gewebespezifische Alkalische Phosphatase (TNAP) identifiziert, deren Funktion wahrscheinlich auch bei embryonalen Stammzellen eine wichtige Rolle spielt [79].

STRO-1 ist ein Zelloberflächenantigen, welches von hBMSC und kernhaltigen Erythrozytenvorläufern exprimiert wird. Bei MSC gilt es als Marker einer Subpopulation mit verstärktem Differenzierungspotenzial [20,78].

STRO-1 wurde in 2,46%, MSCA-1 in 10,80% der untersuchten hSGSC nachgewiesen. Die Antigene CD117, CD271, STRO-1 und MSCA-1 wurden in den untersuchten hBMSC in deutlich geringerem Maße exprimiert (siehe 3.2).

Im Zeitverlauf über die Passagen drei, sechs und neun war die Expression der meisten Marker stabil mit gleichbleibendem Anteil positiver und negativer Zellen. Interessant war der Marker CD90, welcher mit zunehmender Passage vermehrt exprimiert wurde. Am ehesten ist davon auszugehen, dass hier eine positive Selektion CD90 positiver Zellen erfolgte. Die Marker CD271 und MSCA-1 unterlagen hingegen einer Abnahme der Expressionshäufigkeit. Diese Beobachtung kann mit Prozessen der zellulären in-vitro Seneszenz erklärt werden. Sie führt zu einer Abnahme der Expression einzelner, Trypsin sensitiver Antigene [68].

Zusammenfassend entspricht das immunphänotypische Expressionsmuster der hSGSC den Anforderungen an MSC und ist vergleichbar mit den parallel durchgeführten Untersuchungen an hBMSC. Zu betonen ist der hohe Anteil CD34 positiver Zellen, welcher bislang nicht in der Literatur für hSGSC diskutiert wurde. Die Expression weiterer Stammzellmarker wie CD117, CD271, STRO-1 und MSCA-1 war in den hSGSC stärker ausgeprägt als in den hBMSC und spricht möglicherweise für ein erhöhtes Proliferations- und Differenzierungspotenzial [7,13,14,51]. Dies konnte auch exemplarisch am Wachstumsverlauf von Fall 10 dargestellt werden (siehe 3.2). Diese Kultur hatte mit 37,36% einen hohen Anteil MSCA-1 positiver Zellen und zeigte eine überdurchschnittliche Proliferationskapazität. Dies ist allerdings bislang ein deskriptiver Zusammenhang ohne Nachweis einer Kausalität.

Um den Einfluss von MSCA-1 auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten zu testen, wurde mittels der MACS Methode versucht, MSCA-1 positive und negative Zellen zu separieren und getrennt zu kultivieren. Erste diesbezügliche Versuche wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit gestartet. Schwierigkeiten bereitete allerdings die geringe Anzahl von MSCA-1 positiven Zellen in manchen Kulturen, zumal die Effizienz der Separation von MSCA-1 positiven Zellen sehr gering war. Ebenso problematisch war die Tatsache der Dauer und Toxizität der Prozedur. Durch vielfache Kühl- und Waschschritte wurden die empfindlichen Zellen in ihrem Wachstumsverhalten beeinträchtigt, so dass Differenzierungsexperimente erst in höheren Passagen stattfinden konnten. Derzeit ist diese Methode auf Grund der beschriebenen Problematik nicht geeignet, um Zusammenhänge zwischen MSCA-1 Expression und Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten zu untersuchen.

4.2 Differenzierung von hSGSC in Azinuszellen

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass eine Differenzierung von MSC über die Zellreihen des mesodermalen Keimblatts hinaus möglich ist. Es ist mittlerweile gelungen, hBMSC in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Eine entodermale Differenzierung erfolgte in Inselzellen des Pankreas [16], Leberzellen [83] sowie Epithelzellen der Atemwege [82]. Eine ektodermale Differenzierung in neuronale Zellen ist ebenfalls beschrieben worden [52,107]. Das Potenzial zur Differenzierung über das mesodermale Keimblatt hinaus ist umso interessanter, als dass sich hierdurch neben klassischen Tissue Engineering Ansätzen mit Knochen- und Knorpelgewebe neue Ansätze für die Regeneration von soliden Organen ergeben. So sind potenzielle Ziele der Regenerativen Medizin die Therapie von Morbus Parkinson, Diabetes mellitus Typ 1, Leberversagen oder Herzinfarkten [57,105].

Eine Differenzierung von MSC in Azinuszellen scheint daher möglich und bietet insbesondere auch die Chance für eine kurative Therapieoption bei radiogener Xerostomie. In Tierversuchen konnte ohne die Kenntnisse der Vorgänge und Bedingungen einer in-vitro Differenzierung von MSC in Azinuszellen gezeigt werden, dass eine Regeneration der Speicheldrüsen durch Stammzelltherapie möglich ist. BMSC galten hierfür lange als einfach zugängliche Quelle multipotenter Stammzellen. Männliche, markierte BMSCs wurden weiblichen Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung intravenös injiziert. Bei den so entstandenen Chimären wurden selektiv die Speicheldrüsen bestrahlt. Nach Mobilisation der BMSC mittels G-CSF konnte ein Homing der Stammzellen im zuvor radiogen geschädigtem Gewebe mit einer limitierten Geweberegeneration beobachtet werden sowie eine Verbesserung der Speichelproduktion festgestellt werden. Eine Transdifferenzierung der BMSC in Speichel produzierende Azinuszellen blieb histomorphologisch allerdings aus [50]. Dies demonstriert die Rolle von Stammzellen bei radiogener Speicheldrüsenschädigung und deren Regeneration [43].

Andere Ansätze beschäftigen sich mit der in-vitro Differenzierung von MSC in Azinuszellen. Als entscheidend erwies sich hierbei die Kultivierung der Zellen in einem dreidimensionalen Zellkultursystem unter Zugabe verschiedener Wachstums- und Induktionsfaktoren. Verwendet wurden hier insbesondere die Faktoren EGF, FGF-2, Stickstoff-Supplement, Insulin und Dexamethason [26,27,51].

In der Literatur sind bereits Arbeiten über die Differenzierung von Vorläuferzellen aus Ratten in Azinuszellen veröffentlicht worden [51]. Hierbei wurden die frisch aus Speicheldrüsen von Ratten isolierten Zellen sofort im Differenzierungsmedium kultiviert. Bereits nach drei Tagen konnte eine Aggregation und Proliferation der Zellen zu Salisphären beobachtet und die Sekretion von α-Amylase und Muzin nachgewiesen werden [51]. Nach Auflösung der Salisphären konnten die einzelnen Zellen in Matrigel resuspendiert werden, woraufhin sich neue azinotubuläre und duktale Strukturen im Differenzierungsmedium bildeten. Diese Versuche konnten zum Teil auch schon auf humane Zellen übertragen werden [27,51]. Allerdings ist zu beachten, dass die Zellen sofort nach Isolation aus den Speicheldrüsen im Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Es ist in den durchgeführten Versuchen nicht zu erkennen, welche Zellpopulation aus den Speicheldrüsen für die Bildung der azinotubulären und duktalen Strukturen verantwortlich war. Ein Nachweis, dass es sich bei den gewonnenen Zellen um MSC handelt, ist bislang nicht erfolgt, aber möglicherweise entscheidend für die Beurteilung der Möglichkeiten dieser Verfahren in der Regenerativen Medizin.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Zellen aus humanen Speicheldrüsenpräparaten zu isolieren und zu kultivieren. Auf Grund der gezeigten Ergebnisse konnten die gewonnen hSGSC als MSC charakterisiert werden. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Differenzierung der hSGSC in Azinuszellen.

Die Versuche erfolgten mit dem in der Literatur beschriebenen spezifischen Differenzierungsmedium mit EGF, FGF-2, Stickstoff-Supplement, Insulin und Dexamethason [26,27,51]. Es wurden verschiedene Matrices getestet; so wurden die Versuche mit verschiedenen Zellzahlen in Matrices aus verschiedenen Konzentrationen von Alginat, Kollagen Typ I, Matrigel und Kollagen Typ I - Matrigel Mischungen durchgeführt. Morphologisch zeigten sich die besten Ergebnisse bei der Verwendung von Matrigel in einer Konzentration von 7,5mg/ml. Ausschlaggebend ist hierbei vermutlich die Rolle der EZM in der Signaltransduktion zwischen den Zellen, vermittelt durch Bestandteile des Matrigels, vorwiegend Laminin-1 und TGF-β3 [35].

Der Nachweis der Differenzierung erfolgte durch morphologische Beurteilung unter dem Phasenkontrastmikroskop. Bei einer Zellzahl von 10^4 Zellen pro well zeigte sich morphologisch das Bild differenzierter Azini mit tubulären und duktalen An-

teilen. Problematisch war die Gewinnung von Probenmaterial für einen histologischen und immunhistochemischen Nachweis der Differenzierung. Es konnte kein Fixierungsverfahren etabliert werden, um diese Strukturen zu erhalten und somit histologisch nachzuweisen. Durch Erhöhung der Zellzahl auf bis zu 10^5 Zellen pro well bildeten sich stabile Aggregate, welche, in HistoGel eingebettet, fixiert werden konnten. Allerdings ging auch hierbei ein Teil der Struktur verloren.

Histologisch zeigte sich die Bildung von runden, azinusähnlichen Strukturen, welche sich PAS positiv darstellten. Immunhistochemisch gelang der Nachweis von Vimentin und Kallikrein 13. Vimentin ist ein Intermediärfilament und gilt als Marker für Zellen mesenchymaler Herkunft. Er ist positiv in myoepithelialen Zellen und duktalen Zellen [5,5,56]. Kallikreine sind Serinproteasen, welche inaktive Vorläufer von Gewebehormonen, sogenannte Kininogene, in deren aktive Form, Kinine, überführen. Kallikrein 13 gehört zu den glandulären Kallikreinen und wird in den Speicheldrüsen vor allem in den Ausführungsgängen exprimiert [61]. Beide Antikörper werden als Marker duktaler Differenzierung eingesetzt [5,56,61] und waren in den hier untersuchten Schnitten positiv.

Das Enzym α-Amylase wird von serösen Azini gebildet und spielt eine Rolle bei der Spaltung von Glykosidbindungen. α-Amlyase gilt als Marker einer erfolgten Differenzierung in Azinuszellen [73].

α-Amylase konnte im intakten Speicheldrüsenpräparat intraazinär nachgewiesen werden, in den differenzierten Zellen zeigte sich ein schwacher Nachweis von α-Amylase. Vermutlich war die Sekretion von α-Amylase in den gebildeten Strukturen nur gering. Um die Sekretion von α-Amylase künftig besser nachzuweisen, besteht die Möglichkeit, das Enzym im verwendeten Kulturmedium durch Absorptionsfotometrie nachzuweisen [106].

Der Nachweis der erfolgten Differenzierung beruht bislang also vorwiegend auf der morphologischen Anordnung und Aggregation der Zellen in der Induktionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse unterstützen die These einer erfolgten Differenzierung in Azinuszellen, allerdings war eine Färbung der Kontrollgruppe aufgrund der fehlenden Fixierbarkeit der Strukturen durch fehlende Zellaggregation nicht möglich. Diesem methodischen Mangel unterliegen auch die anderen, bereits veröffentlichten Arbeiten über Azinusdifferenzierung in-vitro [27,51,86]. Die Differenzierung in duktale

Strukturen erschien in unseren Ergebnissen immunhistochemisch stärker ausgeprägt als eine Differenzierung in aktive Azinuszellen. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bisherige Erkenntnisse darauf hindeuten, dass SGSC im duktalen Kompartiment der Speicheldrüsen lokalisiert sind [54].

Durch die bereits stattgefundene Gewinnung von Probenmaterial für eine RNA-Isolation aus den differenzierten Zellen wird künftig eine Genexpressionsanalyse den qualitativen und quantitativen Nachweis der erfolgreichen Differenzierung erbringen können. Spezifische Marker von Azinuszellen können so im Vergleich zu den nicht-differenzierten Zellen auf Genexpressionsebene untersucht werden. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit war die Etablierung dieser Methode noch nicht abgeschlossen.

Klinisch orientierte Experimente zur Regeneration von Speicheldrüsen durch Verwendung von Stammzellen wurden bereits am Tiermodell durchgeführt. Nach Kultivierung von Vorläuferzellen als Salisphären über 10 Tage wurde die Struktur aufgelöst und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht und selektiert. Hierbei war ein unterschiedlich hoher Anteil der Zellen in den Salisphären positiv für die Stammzellmarker Sca-1, c-Kit und Musashi-1. Die intraglanduläre Injektion von 300 bis 1000 c-Kit positiven Zellen (etwa 0,3% der Gesamtzellen) aus den Salisphären zeigte eine nahezu vollständige Regeneration der zuvor mit 15 Gray bestrahlten Speicheldrüsen [26,51]. Dies unterstreicht das Potenzial der verwendeten Zellen und zeigt die künftigen Möglichkeiten in diesem Bereich auf.

4.3 Ausblick

In absehbarer Zeit gilt es, geeignete Verfahren zur Fixierung der Azinuszellaggregate zu etablieren, um die Differenzierung histologisch und immunhistochemisch sicher nachzuweisen. Parallel hierzu sollte eine Genexpressionsanalyse spezifischer Markergene durchgeführt werden. Hierdurch kann die Differenzierung von als MSC charakterisierten hSGSC in Azinuszellen endgültig bewiesen werden.

Das klinische Ziel einer effektiven Behandlung bei Xerostomie aufgrund einer irreversiblen Speicheldrüsenschädigung beliebiger Ätiologie scheint mit regenerativen Methoden unter Verwendung von hSGSC möglich zu sein.

Die hSGSC stellen aufgrund ihrer verhältnismäßig einfachen Gewinnung und ihrer ethisch unbedenklichen Verwendung eine geeignete Quelle hierfür dar. In Verbindung mit dem dargestellten pluripotenten Differenzierungsverhalten und ihrer Expression von Markerproteinen, welche in der Literatur mit potenten Stammzelleigenschaften assoziiert sind, scheinen zukünftig verschiedene Verfahren zum regenerativen Einsatz möglich zu sein. Zudem stellt sich bei hMSC nach dem aktuellen Wissensstand nicht das Problem unkontrollierter Differenzierung und Proliferation mit teratogener Entartung sowie immunogener Abstoßungsreaktionen.

Verfolgt werden können klassische Ansätze aus dem Bereich des Tissue Engineering mit dem Ziel einer in-vitro hergestellten, artifiziellen Speicheldrüse. Als geeignete Matrix erscheint Matrigel in Verbindung mit einer strukturfesten Trägersubstanz, wie zum Beispiel Kollagen, sinnvoll zu sein.

Ebenfalls sind klassische Verfahren der Stammzelltherapie möglich, wie zum Beispiel die intravenöse oder intraglanduläre Injektion von hSGSC. Inwiefern ein Homing und eine Differenzierung der Zellen in den Speicheldrüsen stattfinden wird, muss künftig in Tierversuchsmodellen geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch mechanische und enzymatische Verfahren Zellen aus humanen Speicheldrüsenpräparaten isoliert und in Zellkultur überführt. Hierbei zeigte sich unter standardisierten Kulturbedingungen ein über 17 Passagen erhaltenes Wachstum der Zellen, adhärent auf Polystyrol - Zellkulturflaschen. Morphologie und Wachstumseigenschaften waren vergleichbar mit den parallel kultivierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus humanem Knochenmark.

Die isolierten Zellen wiesen in ihrem Immunphänotyp und in ihrem Differenzierungspotenzial MSC Charakteristik auf und konnten als human Salivary Gland Stem Cells (hSGSC) bezeichnet werden. Durchflusszytometrisch wurden klassische MSC Marker wie Cluster of Differentiation (CD) 29, CD44, CD54, CD73, CD90 und CD105 nachgewiesen. Im Vergleich zu den CD34 negativen MSC aus humanem Knochenmark wurde bei den untersuchten hSGSC eine geringe Expression von CD34 detektiert. Marker wie das Mesenchymal Stem Cell Antigen 1 (MSCA-1), CD117, STRO-1 und CD271 wurden in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert und bestätigen den Stammzellcharakter der isolierten Zellen.

Die Differenzierung der hSGSC erfolgte zur Darstellung ihrer multipotenten Stammzellcharakteristik in adipogene, osteogene und chondrogene Zellen. Der Nachweis der Differenzierung erfolgte mittels histologischer und immunhistochemischer Methoden.

Um die Möglichkeit einer künftigen Verwendung dieser Zellen in regenerativen Modellen zur Behandlung der irreversiblen Speicheldrüsenschädigung zu testen, erfolgte die in-vitro Differenzierung der hSGSC in Azinuszellen. Hierfür stellte sich reines Matrigel als die am besten geeignete dreidimensionale Matrix heraus und wurde in Kombination mit einem spezifischen Differenzierungsmedium verwendet. Der Nachweis der stattgefundenen Differenzierung erfolgte nach morphologischen Kriterien sowie durch histologische und immunhistochemische Färbemethoden. Eine Genexpressionsanalyse der Proben steht aus.

Mit dem Wissen des in-vitro Potenzials der hSGSC sind regenerative Strategien zur Behandlung der radiogenen Speicheldrüsenschädigung durch Methoden des Tissue Engineering oder der Stammzelltherapie potenziell möglich.

6 Literaturverzeichnis

1. Altiok, S., Xu, M., und Spiegelman, B. M.: PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. Genes Dev 11: 1987-1998 (1997)

2. Astori, G., Vignati, F., Bardelli, S., Tubio, M., Gola, M., Albertini, V., Bambi, F., Scali, G., Castelli, D., Rasini, V., Soldati, G., und Moccetti, T.: "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. J Transl Med 5: 55 (2007)

3. Avila, J. L., Grundmann, O., Burd, R., und Limesand, K. H.: Radiation-induced salivary gland dysfunction results from p53-dependent apoptosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 73: 523-529 (2009)

4. Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B., und Murphy, J. M.: Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp Cell Res 268: 189-200 (2001)

5. Bartel-Friedrich, S., Friedrich, R. E., Lautenschlager, C., Holzhausen, H. J., und Moll, R.: Dose-response relationships on the expression profile of cytokeratins and vimentin in rat submandibular glands following fractionated irradiation. Anticancer Res 20: 4917-4926 (2000)

6. Battula, V. L., Treml, S., Abele, H., und Buhring, H. J.: Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody. Differentiation 76: 326-336 (2008)

7. Battula, V. L., Treml, S., Bareiss, P. M., Gieseke, F., Roelofs, H., de Zwart, P., Muller, I., Schewe, B., Skutella, T., Fibbe, W. E., Kanz, L., und Buhring, H. J.: Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. Haematologica 94: 173-184 (2009)

8. Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R. W., Lecapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A. P., D'Alessandro, D. A., Zias, E., Quaini, F., Urbanek, K., Michler, R. E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A., und Anversa, P.: Human cardiac stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 14068-14073 (2007)

9. Boiret, N., Rapatel, C., Veyrat-Masson, R., Guillouard, L., Guerin, J. J., Pigeon, P., Descamps, S., Boisgard, S., und Berger, M. G.: Character-

ization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. Exp Hematol 33: 219-225 (2005)

10. Bonfield, T. L. und Caplan, A. I.: Adult mesenchymal stem cells: an innovative therapeutic for lung diseases. Discov Med 9: 337-345 (2010)

11. Braam, P. M., Roesink, J. M., Raaijmakers, C. P., Busschers, W. B., und Terhaard, C. H.: Quality of life and salivary output in patients with head-and-neck cancer five years after radiotherapy. Radiat Oncol 2: 3 (2007)

12. Brittan, M. und Wright, N. A.: The gastrointestinal stem cell. Cell Prolif 37: 35-53 (2004)

13. Buhring, H. J., Battula, V. L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., und Vogel, W.: Novel markers for the prospective isolation of human MSC. Ann N Y Acad Sci 1106: 262-271 (2007)

14. Buhring, H. J., Treml, S., Cerabona, F., de Zwart, P., Kanz, L., und Sobiesiak, M.: Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. Ann N Y Acad Sci 1176: 124-134 (2009)

15. Burford-Mason, A. P., Cummins, M. M., Brown, D. H., MacKay, A. J., und Dardick, I.: Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. J Oral Pathol Med 22: 440-446 (1993)

16. Chen, L. B., Jiang, X. B., und Yang, L.: Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. World J Gastroenterol 10: 3016-3020 (2004)

17. Coppes, R. P., Zeilstra, L. J., Kampinga, H. H., und Konings, A. W.: Early to late sparing of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. Br J Cancer 85: 1055-1063 (2001)

18. Coppes, R. P., Meter, A., Latumalea, S. P., Roffel, A. F., und Kampinga, H. H.: Defects in muscarinic receptor-coupled signal transduction in isolated parotid gland cells after in vivo irradiation: evidence for a non-DNA target of radiation. Br J Cancer 92: 539-546 (2005)

19. De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., Dragoo, J. L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., und Hedrick, M. H.: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organs 174: 101-109 (2003)

20. Dennis, J. E., Carbillet, J. P., Caplan, A. I., und Charbord, P.: The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. Cells Tissues Organs 170: 73-82 (2002)

21. Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., und Prockop, D. J.: Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 1999 107 (2): 275-281 (2012)

22. Döhner, H.: Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 412-419 (2007)

23. Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Buchner, T., Burnett, A. K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Lowenberg, B., und Bloomfield, C. D.: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 115: 453-474 (2010)

24. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, Dj, und Horwitz, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8: 315-317 (2006)

25. Esko, J. D., Kimata, K., und Lindahl, U.: Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans(2009)

26. Feng, J. und Coppes, R. P.: Can we rescue salivary gland function after irradiation? ScientificWorldJournal 8: 959-962 (2008)

27. Feng, J., van der, Zwaag M., Stokman, M. A., van Os, R., and Coppes, R. P.: Isolation and characterization of human salivary gland cells for stem cell transplantation to reduce radiation-induced hyposalivation. Radiother Oncol 92: 466-471 (2009)

28. Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A., und Ruadkow, I. A.: Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 2: 83-92 (1974)

29. Gitelman, S. E., Kirk, M., Ye, J. Q., Filvaroff, E. H., Kahn, A. J., und Derynck, R.: Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells. Cell Growth Differ 6: 827-836 (1995)

30. Golding, M., Sarraf, C. E., Lalani, E. N., Anilkumar, T. V., Edwards, R. J., Nagy, P., Thorgeirsson, S. S., und Alison, M. R.: Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. Hepatology 22: 1243-1253 (1995)

31. Gorjup, E., Danner, S., Rotter, N., Habermann, J., Brassat, U., Brummendorf, T. H., Wien, S., Meyerhans, A., Wollenberg, B., Kruse, C., und von Briesen, H.: Glandular tissue from human pancreas and salivary

gland yields similar stem cell populations. Eur J Cell Biol 88: 409-421 (2009)

32. Green, H. und Meuth, M.: An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell 3: 127-133 (1974)

33. Gregoire, F. M., Smas, C. M., und Sul, H. S.: Understanding adipocyte differentiation. Physiol Rev 78: 783-809 (1998)

34. Hisatomi, Y., Okumura, K., Nakamura, K., Matsumoto, S., Satoh, A., Nagano, K., Yamamoto, T., und Endo, F.: Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. Hepatology 39: 667-675 (2004)

35. Hoffman, M. P., Kibbey, M. C., Letterio, J. J., und Kleinman, H. K.: Role of laminin-1 and TGF-beta 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). J Cell Sci 109 (Pt 8): 2013-2021 (1996)

36. Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., und Bruder, S. P.: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 64: 295-312 (1997)

37. Jaiswal, R. K., Jaiswal, N., Bruder, S. P., Mbalaviele, G., Marshak, D. R., und Pittenger, M. F.: Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 275: 9645-9652 (2000)

38. Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., Markham, A. F., Jack, A., Emery, P., und McGonagle, D.: Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. Arthritis Rheum 46: 3349-3360 (2002)

39. Kaiser, S., Hackanson, B., Follo, M., Mehlhorn, A., Geiger, K., Ihorst, G., und Kapp, U.: BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. Cytotherapy 9: 439-450 (2007)

40. Kim, C. F., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R. T., und Jacks, T.: Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell 121: 823-835 (2005)

41. Kochar, PG: What are stem cells? http://www.csa com/discoveryguides/stemcell/overvie.php (19.04.2013)

42. Kogler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A. I., Colletti, E. J., Almeida-Porada, G., Muller, H. W., Zanjani, E., und Wernet, P.: A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrin-

sic pluripotent differentiation potential. J Exp Med 200: 123-135 (2004)

43. Konings, A. W., Coppes, R. P., und Vissink, A.: On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 62: 1187-1194 (2005)

44. Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., und May, W. S.: CD34: structure, biology, and clinical utility. Blood 87: 1-13 (1996)

45. Kruse, C., Kajahn, J., Petschnik, A. E., Maass, A., Klink, E., Rapoport, D. H., und Wedel, T.: Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. Ann Anat 188: 503-517 (2006)

46. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., und Chen, T. H.: Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 103: 1669-1675 (2004)

47. Lee, R. H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H. S., Suh, K., Bae, Y. C., und Jung, J. S.: Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cell Physiol Biochem 14: 311-324 (2004)

48. Leri, A., Kajstura, J., und Anversa, P.: Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. Physiol Rev 85: 1373-1416 (2005)

49. Linnekin, D.: Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. Int J Biochem Cell Biol 31: 1053-1074 (1999)

50. Lombaert, I. M., Wierenga, P. K., Kok, T., Kampinga, H. H., deHaan, G., und Coppes, R. P.: Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands. Clin Cancer Res 12: 1804-1812 (2006)

51. Lombaert, I. M., Brunsting, J. F., Wierenga, P. K., Faber, H., Stokman, M. A., Kok, T., Visser, W. H., Kampinga, H. H., de Haan, G., und Coppes, R. P.: Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. PLoS One 3: e2063 (2008)

52. Ma, Y., Xu, Y., Xiao, Z., Yang, W., Zhang, C., Song, E., Du, Y., und Li, L.: Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. Stem Cells 24: 315-321 (2006)

53. Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., und Mosca, J. D.: Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. J Biomed Sci 10: 228-241 (2003)

54. Man, Y. G., Ball, W. D., Marchetti, L., und Hand, A. R.: Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. Anat Rec 263: 202-214 (2001)

55. Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., und Fagioli, F.: Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. J Cell Biochem 97: 744-754 (2006)

56. Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Niedobitek, G., Kim, K. Y., und Stein, H.: Vimentin expression of newly formed rat bile duct epithelial cells in secondary biliary fibrosis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 415: 237-242 (1989)

57. Mohyeddin-Bonab, M., Mohamad-Hassani, M. R., Alimoghaddam, K., Sanatkar, M., Gasemi, M., Mirkhani, H., Radmehr, H., Salehi, M., Eslami, M., Farhig-Parsa, A., Emami-Razavi, H., Alemohammad, M. G., Solimani, A. A., Ghavamzadeh, A., und Nikbin, B.: Autologous in vitro expanded mesenchymal stem cell therapy for human old myocardial infarction. Arch Iran Med 10: 467-473 (2007)

58. Muller, I., Kordowich, S., Holzwarth, C., Spano, C., Isensee, G., Staiber, A., Viebahn, S., Gieseke, F., Langer, H., Gawaz, M. P., Horwitz, E. M., Conte, P., Handgretinger, R., und Dominici, M.: Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. Cytotherapy 8: 437-444 (2006)

59. Okumura, K., Nakamura, K., Hisatomi, Y., Nagano, K., Tanaka, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Umeyama, K., Matsumoto, K., Yamamoto, T., und Endo, F.: Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. Hepatology 38: 104-113 (2003)

60. Oliver, C., Waters, J. F., Tolbert, C. L., und Kleinman, H. K.: Growth of exocrine acinar cells on a reconstituted basement membrane gel. In Vitro Cell Dev Biol 23: 465-473 (1987)

61. Petraki, C. D., Karavana, V. N., und Diamandis, E. P.: Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study. J Histochem Cytochem 51: 493-501 (2003)

62. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., und Marshak, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147 (1999)

63. Prasad, K. N., Edwards-Prasad, J., Carvalho, E., La Rosa, F. G., Balbinder, E., Meyers, A., und Quissell, D.: Establishment of primary cultures of rat and human parotid epithelial cells for transfection experiments. In Vitro Cell Dev Biol 28A: 493-499 (1992)

64. Prasad, K. N., Carvalho, E., Edwards-Prasad, J., La Rosa, F. G., Kumar, R., und Kumar, S.: Establishment and characterization of immortalized cell lines from rat parotid glands. In Vitro Cell Dev Biol Anim 30A: 321-328 (1994)

65. Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., und Deliliers, G. L.: Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. Exp Hematol 30: 783-791 (2002)

66. Redman, R. S.: On approaches to the functional restoration of salivary glands damaged by radiation therapy for head and neck cancer, with a review of related aspects of salivary gland morphology and development. Biotech Histochem 83: 103-130 (2008)

67. Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland 2007/2008. In: Robert Koch Institut: Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 8. Ausgabe (2012) http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/krebs_in_deutschland_2012.html (19.04.2012)

68. Rojewski M.T., Weber, B. M., und Schrezenmeier, H: Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. Transfus Med Hemother Vol. 35, No. 3, 2008: 168-184 (2008)

69. Rosen, E. D. und Spiegelman, B. M.: Molecular regulation of adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 145-171 (2000)

70. Rotter, N., Oder, J., Schlenke, P., Lindner, U., Bohrnsen, F., Kramer, J., Rohwedel, J., Huss, R., Brandau, S., Wollenberg, B., und Lang, S.: Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. Stem Cells Dev 17: 509-518 (2008)

71. Sackstein, R., Merzaban, J. S., Cain, D. W., Dagia, N. M., Spencer, J. A., Lin, C. P., und Wohlgemuth, R.: Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. Nat Med 14: 181-187 (2008)

72. Schlenk, R. F., Dohner, K., Krauter, J., Frohling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A., und Dohner, H.: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Engl J Med 358: 1909-1918 (2008)

73. Seifert, G., Doerr, W., und Uehlinger, E.: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie der Speichelsekretion, Biochemie der Speichelzusammensetzung.2: 1-54 (1996)

74. Sekiya, I., Koopman, P., Tsuji, K., Mertin, S., Harley, V., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., und Noda, M.: Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. J Endocrinol 169: 573-579 (2001)

75. Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M. L., Wu, L., Lindeman, G. J., und Visvader, J. E.: Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. Nature 439: 84-88 (2006)

76. Shirasuna, K., Sato, M., und Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. Cancer 48: 745-752 (1981)

77. Simmons, P. J. und Torok-Storb, B.: CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. Blood 78: 2848-2853 (1991 a)

78. Simmons, P. J. und Torok-Storb, B.: Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood 78: 55-62 (1991 b)

79. Sobiesiak, M., Sivasubramaniyan, K., Hermann, C., Tan, C., Orgel, M., Treml, S., Cerabona, F., de Zwart, P., Ochs, U., Muller, C. A., Gargett, C. E., Kalbacher, H., und Buhring, H. J.: The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. Stem Cells Dev 19: 669-677 (2010)

80. Sodek, J., Ganss, B., und McKee, M. D.: Osteopontin. Crit Rev Oral Biol Med 11: 279-303 (2000)

81. Soncini, M., Vertua, E., Gibelli, L., Zorzi, F., Denegri, M., Albertini, A., Wengler, G. S., und Parolini, O.: Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. J Tissue Eng Regen Med 1: 296-305 (2007)

82. Spees, J. L., Olson, S. D., Ylostalo, J., Lynch, P. J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M. Y., und Prockop, D. J.: Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 2397-2402 (2003)

83. Stock, P., Staege, M. S., Muller, L. P., Sgodda, M., Volker, A., Volkmer, I., Lutzkendorf, J., und Christ, B.: Hepatocytes derived from adult stem cells. Transplant Proc 40: 620-623 (2008)

84. Stritch School of Medicine und Loyola University of Chicago: Histo Images. http://www.meddean.luc.edu/LUMEN/MedEd/Histo/HistoImages/hl9-21.jpg (19.04.2012)

85. Sundin, M., Ringden, O., Sundberg, B., Nava, S., Gotherstrom, C., und Le Blanc, K.: No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. Haematologica 92: 1208-1215 (2007)

86. Szlavik, V., Szabo, B., Vicsek, T., Barabas, J., Bogdan, S., Gresz, V., Varga, G., O'Connell, B., und Vag, J.: Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract. Tissue Eng Part A 14: 1915-1926 (2008)

87. Takahashi, S., Shinzato, K., Nakamura, S., Domon, T., Yamamoto, T., und Wakita, M.: Cell death and cell proliferation in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. J Oral Pathol Med 33: 23-29 (2004)

88. Takahashi, S., Nakamura, S., Domon, T., Yamamoto, T., und Wakita, M.: Active participation of apoptosis and mitosis in sublingual gland regeneration of the rat following release from duct ligation. J Mol Histol 36: 199-205 (2005)

89. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C., und Ferrebee, J. W.: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med 257: 491-496 (1957)

90. Thomas, E. D: Bone marrow transplantation: a review. Semin Hematol 1999 36 (4 Suppl 7): 95-103 (1999)

91. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., und Jones, J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282: 1145-1147 (1998)

92. Thomson, T. M., Rettig, W. J., Chesa, P. G., Green, S. H., Mena, A. C., und Old, L. J.: Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers. Exp Cell Res 174: 533-539 (1988)

93. Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M., und Martin, G. R.: Laminin--a glycoprotein from basement membranes. J Biol Chem 254: 9933-9937 (1979)

94. Timpl, R. und Brown, J. C.: The laminins. Matrix Biol 14: 275-281 (1994)

95. Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Delforge, A., Massy, M., Mortier, C., und Bron, D.: Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. Cytotherapy 6: 372-379 (2004)

96. Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W. E., Rendl, M., und Fuchs, E.: Defining the epithelial stem cell niche in skin. Science 303: 359-363 (2004)

97. Viereck, V., Siggelkow, H., Tauber, S., Raddatz, D., Schutze, N., und Hufner, M.: Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. J Cell Biochem 86: 348-356 (2002)

98. Vissink, A., Jansma, J., Spijkervet, F. K., Burlage, F. R., und Coppes, R. P.: Oral sequelae of head and neck radiotherapy. Crit Rev Oral Biol Med 14: 199-212 (2003)

99. Vissink, A., Burlage, F. R., Spijkervet, F. K., Veerman, E. C., und Nieuw Amerongen, A. V.: Prevention and treatment of salivary gland hypofunction related to head and neck radiation therapy and chemotherapy. Support Cancer Ther 1: 111-118 (2004)

100. Vogel, W., Grunebach, F., Messam, C. A., Kanz, L., Brugger, W., und Buhring, H. J.: Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. Haematologica 88: 126-133 (2003)

101. Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M., und Hong, W. K.: Head and neck cancer. N Engl J Med 328: 184-194 (1993)

102. Vukicevic, S., Kleinman, H. K., Luyten, F. P., Roberts, A. B., Roche, N. S., und Reddi, A. H.: Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. Exp Cell Res 202: 1-8 (1992)

103. Wang, E. A., Israel, D. I., Kelly, S., und Luxenberg, D. P.: Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. Growth Factors 9: 57-71 (1993)

104. Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C., und Chen, C. C.: Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 22: 1330-1337 (2004)

105. Wohrle, J., Merkle, N., Mailander, V., Nusser, T., Schauwecker, P., von Scheidt, F., Schwarz, K., Bommer, M., Wiesneth, M., Schrezenmeier, H., und Hombach, V.: Results of intracoronary stem cell therapy after acute myocardial infarction. Am J Cardiol 105: 804-812 (2010)

106. Wong, D. W. S., Batt, S. B., und Robertson, G. H.: Microassay for Rapid Screening of á-Amylase Activity. J Agric Food Chem 48: 4540-4543 (2000)

107. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., und Black, I. B.: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 61: 364-370 (2000)

108. Zhang, W., Yang, N., und Shi, X. M.: Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). J Biol Chem 283: 4723-4729 (2008)

109. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., und Hedrick, M. H.: Hu-

man adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 13: 4279-4295 (2002)

Danksagung

Danksagung aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.