

Aus dem Institut für Medizinische und Marine Biotechnologie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

Einfluss zwei- und dreidimensionaler Kultur auf das Genexpressionsprofil humaner Parotis-abgeleiteter Stammzellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Leonie C. Hilger

aus Olpe

Lübeck, 2024

1. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. rer. nat. Timo Gemoll

Tag der mündlichen Prüfung:

28. März 2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 3. April 2025

Inhalt

Abstract	1
Zusammenfassung.....	3
1 Einleitung	7
1.1 Aufbau der humanen Speicheldrüsen und ihrer extrazellulären Matrix (EZM)	7
1.2 Speichel, seine Bestandteile und Funktionen	9
1.3 Molekulare, zelluläre und EZM-abhängige Mechanismen der Speichelsekretion	10
1.4 Organogenese der Speicheldrüsen.....	13
Die Rolle der EZM in der Organogenese	14
1.5 Homöostase und Regeneration - Stammzellen der adulten Speicheldrüse?	18
Stammzellmarker Nestin.....	19
1.6 Modelle und Tissue Engineering der Speicheldrüse.....	20
Tierversuche	20
<i>Ex vivo</i> -Kultur von Speicheldrüsengewebe	21
Adhärent kultivierte Speicheldrüsenzellen und Speicheldrüsenzelllinien	21
Komplexe Speicheldrüsenmodelle – Matrigel, Mulden und Mikrofluidik.....	23
1.7 Motivation und Ziel der Arbeit.....	29
Zielsetzung.....	31
2 Material und Methoden.....	34
2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	34
2.2 Kits.....	35
2.3 Primer	35
2.4 Antikörper.....	36
2.5 Verbrauchsmaterial.....	37

2.6	Geräte	38
2.7	Software.....	39
2.8	Humane Gewebeproben	40
2.9	Isolation der humanen Parotis-abgeleiteten Stammzellen	40
2.10	Zellkultur.....	42
	Standardkultur der hPDSCs.....	43
	Differenzierung der hPDSCs durch Medien für epitheliale Zellkultur.....	43
	3D-Kultur der hPDSCs	44
2.11	Lebend-Tot-Färbungen der Sphäroide	46
	Quantitative Analyse der Vitalität	47
	Detailaufnahmen der Lebend-Tot-Färbungen	47
2.12	Genexpressionsanalysen	49
	Ernte und Lyse der Zellkulturen.....	49
	RNA-Extraktion	49
	qRT-PCR.....	50
2.13	Immunhistochemische Analysen	51
	Kryofixierung und Schnitte der Gewebeproben	51
	Ernte und Fixierung der Zellkulturen	52
	Färbeprotokolle	53
	Mikroskopie.....	56
2.14	RNA-Seq.....	56
	Vorbereitung der RNA-Proben	56
	RNA-Seq bei Biosearch™ Technologies.....	56
	Datenaufbereitung	58

3	Ergebnisse	66
3.1	Der Einfluss epithelialer Differenzierungsmedien auf humane Parotis-abgeleitete Stammzellen.....	66
	Veränderte Morphologie und Wachstumsverhalten der hPDSCs in DMEM/F12-EGF und KSFM	66
	Vergleich der Markergen-Expression von hPDSCs in epithelialen Differenzierungsmedien	67
3.2	Der Einfluss von 3D-Kultur auf hPDSCs	70
	Morphologie und Wachstum der hPDSC-Sphäroide in unterschiedlichen Kulturmedien	70
	Vitalität der 3D-Kulturen aus hPDSCs.....	73
	Genexpressionsanalyse ausgewählter Marker.....	77
3.3	Vergleich der Genexpressionsprofile mittels explorativer Gesamttranskriptomanalyse..	83
	Differenzielle Genexpression in den unterschiedlichen Kulturkonditionen der hPDSCs ..	84
	Starke Prägung der Genexpression der hPDSCs durch die Kulturkonditionen	86
	<i>Enrichment</i> von Extrazellulärmatrix-bezogenen Prozessen.....	91
4	Diskussion	103
4.1	Die adhärente hPDSC-Kultur in epithelialen Differenzierungsmedien – ein potenzielles Speicheldrüsenmodell?.....	103
	Optimierung der hPDSC-Kultur in serumfreien Medium erforderlich	103
	Verstärkte Proliferation aber keine eindeutige Speicheldrüsendifferenzierung durch DMEM/F12-EGF	104
4.2	hPDSCs in 3D-Kultur - Sphäroide mit Speicheldrüsencharakter?	108
	Morphologie, Vitalität und Proliferation der Sphäroide.....	108
	Eigenschaften adulter Speicheldrüsen in hPDSC-Sphäroiden?.....	111
	Parallelen zur Speicheldrüsenmorphogenese bei der Genexpression in hPDSC-Sphäroiden	113

4.3	Der Einfluss der Zellkulturbedingungen – Chemische oder mechanische Reize...oder beides?	120
4.4	Limitationen und Ausblick	122
4.5	Fazit	130
	Literatur	132
	Anhang	i
	Poster zu epithelialen Drüsenzellen (TERMIS 2021)	ii
	Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern für sekretorische Marker	iii
	Zusätzliche Infos zur RNA-Seq-Auswertung.....	vi
	Glossar	x
	Abbildungsverzeichnis.....	xiv
	Tabellenverzeichnis	xvii

Abstract

Functioning salivary glands are essential for overall mouth health and a high quality of life. Saliva enables food intake by lubricating the bolus before swallowing. Furthermore, saliva contains components that are antibacterial and promoting wound healing. Diseases like Sjögren's syndrome, radiation of head and neck tumours and even common age-related processes will interfere with proper salivary functions. To this day, there is no cellular model that reflects the salivary glands to an extent to replace animal studies. Especially, acinar cell features are hard to maintain in cell culture. The extracellular matrix (ECM) plays an important role in salivary organogenesis as well as directed saliva flow. A disrupted basement membrane is one symptom of Sjögren's syndrome. Therefore, it is inevitable to consider ECM features in the development of a salivary model.

The main goal of this study was to establish a three-dimensional human salivary gland model that is independent from undefined ECM-hydrogels. The influence of a differentiation medium and the impact of culturing cells in spheroids were to be compared and evaluated. The secondary goal was to develop strategies for future culture techniques by analysing changes in the gene expression profile.

The model was based on primary human parotid gland-derived stem cells (hPDSCs). These hPDSCs were cultured adherently and three-dimensionally in agarose-microwell plates with culture media for epithelial differentiation. Two differentiation media, KFSM and DMEM/F12-EGF, were tested on adherently cultured hPDSCs and compared to standard conditions. The secretory marker expression did not differ significantly in hPDSCs cultured in the three different media. Therefore, hPDSCs were cultured three-dimensionally in all three media, two differentiation media as well as standard medium DMEM10. The spheroids were analysed for morphology, size and vitality as well as secretory marker expression.

An explorative RNAseq experiment was supposed to reveal differences in the gene expression profiles of the hPDSC conditions, but only mRNA of spheroids that were cultured in DMEM/F12-EGF was suitable to be sequenced in RNAseq. However, two comparisons were made based on this RNAseq data:

The influence of the culture medium was evaluated comparing mRNA of hPDSCs cultured adherently in either DMEM10 or DMEM/F12-EGF; and the comparison '2D vs. 3D' was based on mRNA of hPDSCs cultured adherently or three-dimensionally, both in DMEM/F12-EGF. The enrichment of the RNAseq analysis consisted of an over-representation analysis performed using reactome data base and algorithms. This analysis revealed major changes in the ECM organization of hPDSCs in different culture conditions.

Further analyses were focused on genes that are known to be found in adult salivary gland-ECM or known to impact salivary gland organogenesis, especially, in branching morphogenesis. DMEM/F12-EGF had a positive effect on the expression of the genes of interest, but the spheroid culture enhanced this gene expression even further. Also, hPDSCs in spheroids expressed two more secretory markers than adherently cultured hPDSCs, namely cholinergic receptor M3 and aquaporin 5. Another important finding was the identification of genes that need to be activated in order to improve functionality in future hPDSC-spheroid culture. Especially, the supplementation of fibroblast growth factors is required to support a proper branching morphogenesis.

Amongst strategies to improve spheroid culture of hPDSCs, this study shows a three-dimensional human salivary cell culture that is able to express ECM molecules involved in salivary organogenesis. An optimization of this model could lead to new insights into ECM-associated processes in salivary glands such as morphogenesis and Sjögren's syndrome.

Zusammenfassung

Ein physiologisch funktionaler Speichelfluss ist essenziell für die Mundgesundheit und damit für eine hohe Lebensqualität. Speichel trägt wesentlich zur Nahrungsaufnahme bei, indem er reibungsloses Schlucken gewährleistet, und enthält zudem antibakterielle und wundheilungsfördernde Komponenten. Erkrankungen der Speicheldrüse, Bestrahlung zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren und sogar übliche Alterungsprozesse schränken eine normale Speicheldrüsenfunktion ein. Eine der häufigsten sekretorischen Störungen, das Sjögren-Syndrom, ist assoziiert mit Defekten in der Basalmembran, einer spezialisierten Form der Extrazellulärmatrix (EZM). Auch während der Organogenese der Speicheldrüse sowie für einen gerichteten Speichelfluss spielt die EZM, insbesondere die Basalmembran, eine große Rolle. Deshalb ist die Berücksichtigung der EZM auch in der Entwicklung eines Speicheldrüsenmodells unabdingbar. Bisher ist kein zelluläres Modell in der Lage insbesondere azinäre Prozesse in einer Art abzubilden, die Tierversuche obsolet machen könnte. Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge der Speicheldrüse, der umgebenden EZM und Sekretionsstörungen ist die Weiterentwicklung zellulärer Modelle erforderlich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein dreidimensionales Speicheldrüsenmodell aus humanen Zellen zu entwickeln, das funktionale azinäre Zellen hervorbringt, ohne ein undefiniertes EZM-Hydrogel wie Matrigel zu verwenden. Die chemische Beeinflussung durch Kulturmedien in adhärenter Kultur sollte mit dem multifaktoriellen Einfluss von dreidimensionaler Sphäroidkultur verglichen werden. Die differenziell exprimierten Gene sollten zudem Anhaltspunkte für die Optimierung der hPDSC-Kultur zu einem Speicheldrüsentestsystem geben.

Die Grundlage für das zelluläre Speicheldrüsenmodell bildeten primäre humane Parotis-abgeleitete Stammzellen (hPDSCs). Die hPDSCs sollten mithilfe von Kulturmedien für epitheliale Differenzierung, DMEM/F12-EGF und KSFM, und dreidimensionaler Kultur in Agarose-Mikromulden-Platten differenziert werden. Der Effekt der Kulturmedien auf die Expression sekretorischer Marker in adhärenter Kultur unterschied sich nur geringfügig von der Standardkultur in DMEM10. Deswegen wurden alle drei Kulturmedien, auch das Standardmedium DMEM10, in der Sphäroidkultur eingesetzt. Die in serumhaltigen Kulturen entstandenen Sphäroide zeigten eine hohe Vitalität nach 7 Tagen in Kultur und unterschieden sich morphologisch wenig. Die in KSFM

kultivierten hPDSC-Sphäroide hingegen wiesen nach 7 Tagen in Kultur eine geringere Vitalität auf, die sich in einer Auflösung der Sphäroide widerspiegelte. Die vitalen hPDSC-Sphäroide hatten meist eine kompakte, runde Form mit wenigen blasenähnlichen Strukturen an der Oberfläche. Für die Transkriptionsanalysen konnte neben der mRNA aus adhärent kultivierten hPDSCs ausschließlich die mRNA von Sphäroiden aus der Kultur in DMEM/F12-EGF eingesetzt werden (im Folgenden vereinfacht „hPDSC-Sphäroide“ genannt).

qRT-PCR-Experimente mit Primern für Marker wie cholinergem Rezeptor M3 und Aquaporin 5 zeigten, dass hPDSCs die mRNA-Expression dieser Gene teilweise nur in dreidimensionaler Kultur aufrechterhielten. Die Expression dieser Markergene ist essentiell für eine funktionierende Speichelsekretion und stellt einen wichtigen Vorzug der hPDSC-Sphäroide gegenüber den adhärent kultivierten hPDSCs dar.

Eine explorative Gesamttranskriptionsanalyse mittels RNA-Seq sollte weitere Unterschiede der hPDSCs in den verschiedenen Zellkulturbedingungen aufdecken, die über die Expression einzelner Markergene hinaus geht. Es wurden zwei Vergleiche auf Grundlage der RNA-Seq-Daten angestellt: Im Medienvergleich wurde untersucht, welche Gene in hPDSCs aus Standardkultur in hPDSCs aus adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur differenziell exprimiert sind; im 2D-3D-Vergleich wurde ermittelt, wie sich das Transkriptom der hPDSC-Sphäroide von dem Transkriptom der hPDSCs aus adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur unterscheidet. Anhand der differenziell exprimierten Gene wurde eine Überrepräsentationsanalyse mithilfe der reactome-Datenbank durchgeführt. Diese deckte starke Veränderungen in der Organisation der extrazellulären Matrix der hPDSCs in den drei untersuchten Konditionen auf.

Die fortführende Analyse der RNA-Seq-Ergebnisse fokussierte sich deshalb auf Gene, die aus der EZM der adulten Speicheldrüse oder der verzweigenden Morphogenese bekannt sind. Dabei stellte sich heraus, dass DMEM/F12-EGF bereits in adhärenter Kultur einen positiven Effekt auf die Expression der EZM-assoziierten Gene hatte; die Kultur im dreidimensionalen Zellverbund übertraf diesen Effekt aber noch. Von großer Bedeutung ist ebenso, dass Gene identifiziert werden konnten, deren Expression für die Morphogenese und Funktionsfähigkeit eines Speicheldrüsenmodell aktiviert werden muss. Neben dem bereits eingesetzten epithelialen Wachstumsfaktor (EGF) ist besonders die Supplementierung von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren empfehlenswert, um eine

verzweigende Morphogenese und damit eine Differenzierung der hPDSC-Sphäroide zu unterstützen.

Somit hat diese Arbeit vielfältige Strategien zur Optimierung der Sphäroidkultur von hPDSCs geliefert. Von noch größerer Bedeutung ist, dass hPDSC-Sphäroide eigens EZM-Komponenten exprimieren und teilweise sezernieren. Ein Speicheldrüsenmodell, das dazu in der Lage ist, die EZM humaner Speicheldrüsen abzubilden, könnte einen wichtigen Beitrag zur Entdeckung neuer Zusammenhänge von EZM-assoziierten Prozessen oder Erkrankungen der Speicheldrüse leisten.

1 Einleitung

Funktionierender Speichelfluss ist für eine hohe Lebensqualität unabdingbar. Doch Speichel wird von der Öffentlichkeit oft als selbstverständlich oder sogar eklig angesehen. Auch in der Forschung spielen Speicheldrüsen im Vergleich zu anderen Organen wie z. B. der Bauchspeicheldrüse eine untergeordnete Rolle*. Im Jahr 2020 wurde sogar noch eine neue Speicheldrüse entdeckt! Dabei ist Speichel unerlässlich für die Mundgesundheit.

*Suche bei *PubMed Advanced* am 18.1.2024 nach „salivary“ von 2000 bis zum Zeitpunkt der Suche: 53 214 Veröffentlichungen; „pancreatic“ von 2000 bis zum Zeitpunkt der Suche: 161 507 Veröffentlichungen

1.1 Aufbau der humanen Speicheldrüsen und ihrer extrazellulären Matrix (EZM)

Der Mensch besitzt drei große Speicheldrüsen und einige Hundert kleine Speicheldrüsen, die in der Schleimhaut der Mundhöhle liegen (Chibly et al., 2022). Die altbekannten großen paarigen Speicheldrüsen heißen Ohrspeicheldrüse (Parotis, *Glandula parotidea*), Unterkiefer-speicheldrüse (*Glandula submandibularis*) und Unterzungenspeicheldrüse (*Glandula sublingualis*). Die Parotis besteht ausschließlich aus serösen Azini. Ein Azinus ist ein Drüsenendstück, das sezernierende Zellen enthält (siehe Abbildung 1, linke Seite). Unterkiefer- und Unterzungenspeicheldrüse beinhalten sowohl seröse als auch muköse Azini (Junqueira & Carneiro, 1996). Seröse Azini produzieren wässrigen Speichel, der reich an Enzymen wie α -Amylase 1 und Lipase ist (A. M. L. Pedersen et al., 2018). Muköse Azini hingegen sezernieren viskosen Speichel, der Proteine wie Muzine enthält. Muzine sind stark glykosylierte Proteine, die durch ihre hydrophilen Gruppen in Verbindung mit Wasser ein Gel bilden (A. M. L. Pedersen et al., 2018). Im Jahr 2020 wurde eine weitere paarige Speicheldrüse von Valstar et al. beschrieben: die tubariale Speicheldrüse (*Glandula tubaria*) im Nasopharynx. Es besteht die Hypothese, dass diese Speicheldrüse seromuköse Azini enthält und eine Rolle in der Lubrikation des Naso- und Oropharynx spielt (Valstar et al., 2021).

Bei den großen Speicheldrüsen handelt es sich um vielfach verzweigte, tubuloazinöse, exokrine Drüsen. Diese bestehen aus Drüsenendstücken, den Azini, und einem Ausführungsgangsystem aus Gängen. Die Azini sind umgeben von einer Basalmembran, myoepithelialen Zellen und

Bindegewebe, in dem Nerven und Blutgefäße eingebettet sind (Martinez-Madriral & Micheau, 1989). Das Ausführungsgangsystem beginnt mit Schaltstücken, die an die Azini anschließen (siehe Abbildung 1). Darauf folgen Streifenstücke, welche im Ausscheidungsgang enden. Durch das Bindegewebe sind Azinigruppierungen und das Ausführungsgangsystem eingeteilt in Lappen und Läppchen (Junqueira & Carneiro, 1996).

Ein wichtiger Bestandteil des Bindegewebes neben mesenchymalen Zellen ist die Extra-zellulärmatrix (EZM; Martinez-Madriral & Micheau, 1989). Die EZM bildet das Gerüst für Zellen, gibt diesen Stabilität und mechanische Orientierung, erfüllt aber auch andere Funktionen wie z. B. die eines Reservoirs für chemische Botenstoffe (Ruoslahti & Yamaguchi, 1991). Die EZM setzt sich vorrangig aus [1] Faserproteinen wie Kollagenen, [2] Glykoproteinen wie Lamininen und [3] Proteoglykanen zusammen (Hallmann et al., 2022). In den meisten EZM des menschlichen Körpers ist der Hauptbestandteil **Kollagen I** (Naomi et al., 2021). [1] Kollagen I bildet mit anderen Kollagenen (II, III, V und XI) Fibrillen, die wiederum die Grundlage des Netzwerks der EZM formen und für seine Zugfestigkeit sorgen (Hallmann et al., 2022). Die Glykoproteine der EZM [2] stellen eine heterogene Gruppe von Proteinen wie z. B. **Lamininen**, **Fibronektin** und **Integrinen** dar, die viele unterschiedliche lebenswichtige Aufgaben erfüllen. Laminine und Fibronektin beispielsweise sind Zelladhäsionsproteine, Integrine die wichtigste EZM-Rezeptorfamilie. Diese Glykoproteine verbinden das Netzwerk der EZM mit den umliegenden Zellen und ermöglichen so u. a. Zellmigration und beeinflussen diverse Zellfunktionen sowie die Differenzierung (Hallmann et al., 2022; Lafrenie & Yamada, 1998). [3] Proteoglykane oder auch Glykosaminoglykane (GAG), die nicht-Protein-gebundene Form dieses EZM-Bestandteils, sind stark polyanionische, hygroskopische Moleküle. Dadurch können GAG sowohl große Wassermengen als auch Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren und Chemokine binden (Hallmann et al., 2022). Als Speicher dieser Botenstoffe können GAG und Proteoglykane die Entwicklung umliegender Zellen maßgeblich beeinflussen (Patel et al., 2007).

In der Speicheldrüse kommen diese Funktionen der EZM sowohl in der Organogenese als auch im adulten Organ zum Einsatz. Die Speicheldrüsen sind von zwei Formen der EZM umgeben: die EZM, die durch mesenchymale Stromazellen in der Umgebung der Drüsen sezerniert wird, und die Basalmembran, die sowohl durch mesenchymale Stromazellen als auch epitheliale Drüsenzellen

gebildet wird (Brownell et al., 1981; Hallmann et al., 2022). Die Basalmembran befindet sich direkt an den azinären oder daran anliegenden myoepithelialen Zellen. Anders als andere EZM besteht die Basalmembran hauptsächlich aus **Kollagen IV** (Pozzi et al., 2017), was sich in einem großen Anteil Kollagen IV-Untereinheiten in der EZM der Speicheldrüse widerspiegelt (O. N. Tran et al., 2022). Kollagen IV bildet keine Fibrillen, sondern ein flächiges Netzwerk (Hallmann et al., 2022). Die zweite Hauptkomponente von Basalmembranen sind **Laminine**; Heterotrimere, die ebenfalls ein Netzwerk bilden (Heinrich et al., 2022). Weitere, besonders in Basalmembranen präsenzte, EZM-Bestandteile sind das Linkermolekül **Nidogen** und das **Heparansulfatproteoglykan Perlecan** (Erickson & Couchman, 2000; Heinrich et al., 2022). Nidogen ist sowohl in Laminin- als auch Kollagen IV-Basalmembrannetzwerken integriert. Perlecan agiert u. a. in Aggregaten, die die Basalmembrannetzwerke punktuell verbinden (Heinrich et al., 2022). Alle hier beschriebenen Basalmembranbestandteile erfüllen zudem wichtige Funktionen in der Organogenese (siehe „Die Rolle der EZM in der Organogenese“).

1.2 Speichel, seine Bestandteile und Funktionen

Speichel schützt die Schleimhäute der Mundhöhle vor Reibung und äußeren Einflüssen. Die Erhöhung der Gleitfähigkeit durch Befeuchtung des Gewebes wird Lubrikation genannt. Lubrikation ermöglicht Kauen und Schlucken sowie Sprechen. Neben Wasser, das 99,4 % des Speichels ausmacht, sind auch Proteine wie Muzine für diese Gleitfähigkeit verantwortlich (Reiß, 2021). Gel-bildende Muzine ermöglichen die Bildung eines Speisebolus, in dem zerkleinerte Nahrung reibungslos die Speiseröhre passieren kann (A. Pedersen et al., 2002). Zudem tragen Muzine sowie auch prolinreiche Phosphoproteine zur Mineralisation der Zähne bei (Reiß, 2021). Neben der Lubrikation schützt auch die reinigende Wirkung des Speichels die Mundhöhle, indem Speisereste und Pathogene heraus gespült werden. Außerdem enthält Speichel unter anderem pufferndes Bicarbonat, antibakterielle Bestandteile wie Lysozym, fungizide Proteine wie Histatine und Immunglobuline, die zur Immunabwehr beitragen (A. Pedersen et al., 2002; Reiß, 2021; Valdez & Fox, 1991). So gewährleisten Speichelbestandteile die Eliminierung pathogener Mikroben und eine erste Immunabwehr. Speichelbestandteile wie Wachstumsfaktoren tragen zudem zur Wundheilung bei (Reiß, 2021; Valdez & Fox, 1991).

Die wohl bekannteste Funktion des Speichels ist seine Rolle in ersten Verdauungsschritten (A. Pedersen et al., 2002; Valdez & Fox, 1991). Speichel enthält Verdauungsenzyme wie **α -Amylase 1 (AMY1A)**, die nicht resorbierbare Nahrungsbestandteile aufspalten. **α -Amylase 1** ist eines der wichtigsten Speichelenzyme, da es den ersten Schritt der Stärkespaltung katalysiert (Butterworth et al., 2011). Stärke ist ein pflanzliches Kohlenhydrat, das in vielen Grundnahrungsmitteln enthalten ist (Robyt, 2008). Damit trägt das Speichelenzym **α -Amylase 1** zur Verdaulichkeit eines wichtigen Ernährungsgrundstein der Menschheit bei.

Schließlich spielt Speichel auch eine große Rolle in der Geschmackswahrnehmung (Martin et al., 2023; Neyraud, 2014; Weiffenbach et al., 1986). Speichel ist das Medium, in dem geschmacksgebende Stoffe zu den Geschmacksrezeptoren transportiert werden. Besonders wichtig ist dies z. B. bei Kohlenhydraten (Zucker) und Salz, die essenzielle Bestandteile der Ernährung sind. Und auch potenziell giftige Bitterstoffe werden durch den Speichel zu Rezeptoren transportiert und dort registriert. Die Geschmackswahrnehmung mithilfe von Speichel ist also eine nicht zu unterschätzende Funktion: sie ermöglicht die Entscheidungsfähigkeit zu einer ausgewogenen Nahrungsaufnahme sowie das Erkennen giftiger Nahrungsbestandteile (Martin et al., 2023).

1.3 Molekulare, zelluläre und EZM-abhängige Mechanismen der Speichelsekretion

Speichel besteht im Wesentlichen aus Wasser, Proteinen und Elektrolyten. Die Proteinsekretion wird vorrangig durch sympathische, adrenerge Stimulation aktiviert und erfolgt über Exozytose proteingefüllter Vakuolen ins Drüsenlumen (Turner & Sugiya, 2002). Wasser und Elektrolyte stammen aus dem Blut und durchqueren den epithelialen Monolayer durch Membrankanäle sowie parazellulär Richtung Lumen. Eine Voraussetzung für den ordnungsgemäßen Ablauf dieser wässrigen Sekretion ist ein Ionengradient über die basolaterale Membran azinärer Zellen: Intrazellulär ist die Natriumkonzentration geringer als im extrazellulären Raum. Dieser Gradient wird durch die Natrium-Kalium-Pumpe in der basolateralen Membran gebildet und aufrecht erhalten (Nakamoto et al., 2007).

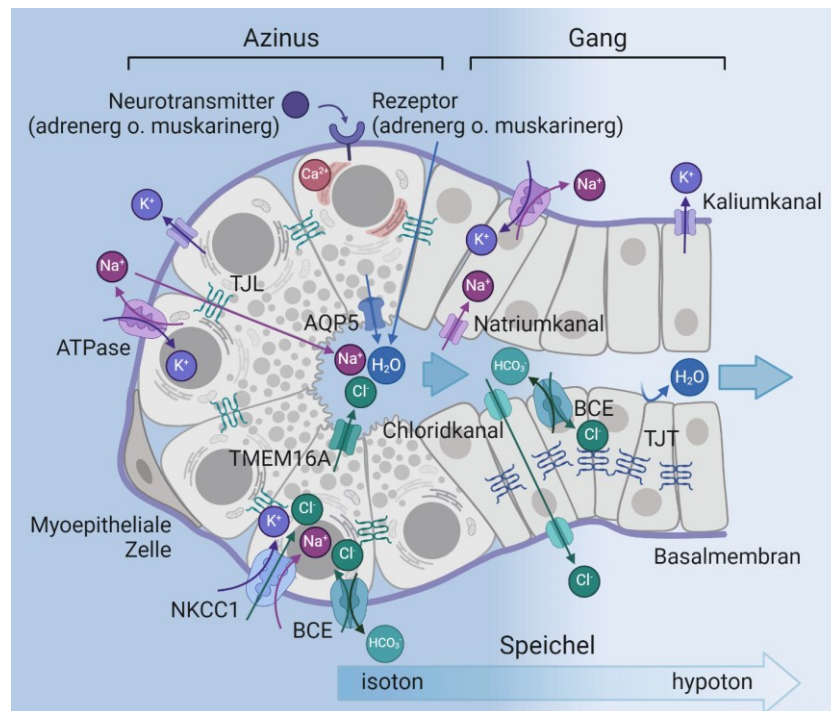


Abbildung 1: Mechanismen der Speichelsekretion. Prozess läuft von links nach rechts ab; die Ionenbewegungen sind exemplarisch für alle Zellen eines Typs gezeigt. Die Ionenkanäle und -pumpen in der basolateralen Membran azinärer Zellen sorgen für Ionengradienten, die nach muskarinergem Stimulus (siehe oben: Neurotransmitter, Rezeptor, rot markiertes Endoplasmatisches Retikulum, intrazellulärer Calciumanstieg) den Strom von Natrium- und Chloridionen ins Lumen ermöglichen; Natrium v. a. parazellulär ermöglicht durch leckende TJ, Chlorid v. a. durch TMEM16A. Durch den osmotischen Druck folgt Wasser durch den Wasserkanal Aquaporin 5 (AQP5) ins Lumen. Gangzellen resorbieren NaCl und der isotope Primärspeichel wird hypoton. Die dichten TJ zwischen den Gangzellen verhindern Rückfluss. Myoepitheliale Zellen können den Speichelfluss durch Kontraktion unterstützen. ATPase: Natrium-Kalium-Pumpe; BCE: Bicarbonat-Chlorid-Austauscher (von engl. *exchanger*); Cl-Kanal: Chloridkanal (z. B. CFTR); NKCC1: Natrium-Kalium-Chlorid-Ko-Transporter; TJ: *tight junction*, zu Deutsch Schlussleiste, TJL: leckende Schlussleiste, TJT: dichte Schlussleiste (T von engl. *tight*); TMEM16A: stimulierbarer Chloridkanal. Mit BioRender.com erstellt, adaptiert anhand von Proctor, 2016.

Die muskarinerge Aktivierung der Speichelsekretion erfolgt über die Stimulation des **cholinergen Rezeptors Muskarinerg 3 (CHRM3)** oder CHRM1 mit Acetylcholin (vgl. muskarinergem Rezeptor in Abbildung 1, (Chibly et al., 2022)). Die Stimulation von **CHRM3** führt eine Ausschüttung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum herbei. Der Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol aktiviert Calcium-abhängige Ionenkanäle (siehe rote Markierung in Abbildung 1). Durch den Einstrom extrazellulärer Calciumionen steigt die Calciumkonzentration im Zytosol weiter an, und Calcium-abhängige Natrium-, Kalium-, Chlorid- und Bicarbonat-Transporter in der basolateralen Membran werden aktiviert (Evans & Turner, 1998; Nakamoto et al., 2007). Die darauffolgenden Prozesse sind in Abbildung 1 verdeutlicht. Chlorid- und

Natriumionen werden in die azinären Zellen transportiert, Bicarbonat wird im Austausch zu Chlorid basolateral exportiert (siehe Abbildung 1, azinäre Zelle unten). Kaliumionen werden zur Homöostase sowohl importiert als auch exportiert (siehe Abbildung 1, durch ATPase und Kaliumkanal). Außerdem wird durch den intrazellulären Calcium-Anstieg der **Chloridionenkanal Transmembrane Member 16A (TMEM16A)**, auch bekannt unter Anoctamin 1 = ANO1) in der apikalen Membran aktiviert (Derouiche et al., 2018). Durch adrenerge Stimulation wird der **Wasserkanal Aquaporin 5 (AQP5)** zur apikalen Membran rekrutiert (Bragiel et al., 2016). Dann sind die Bedingungen für den Sekretionsmechanismus des wässrigen Primärspeichels gegeben. Natriumionen strömen parazellulär von der basolateralen Seite Richtung apikale Seite ins Lumen, Chloridionen gelangen durch **TMEM16A** aus azinären Zellen ins Lumen. Dem dadurch entstehenden osmotischen Druck folgt das Wasser parazellulär und durch **AQP5** ins Lumen.

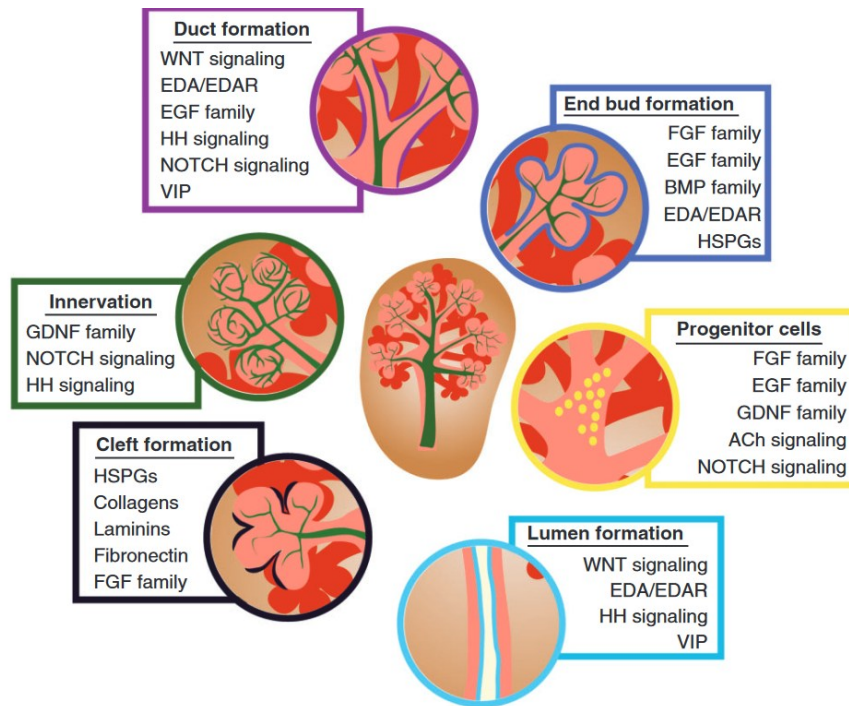
Der Primärspeichel im Lumen der Azini ist isoton und reich an Natriumchlorid. Im Ausführungsgangsystem wird dieser Primärspeichel modifiziert. Gangzellen resorbieren Natrium und Chlorid, sodass der in die Mundhöhle sezernierte Speichel hypoton ist (Porcheri & Mitsiadis, 2019). Dieser Prozess beruht abermals auf dem Natriumgradienten, den Natrium-Kalium-Pumpen auch an der basolateralen Seite von Gangzellen erzeugen. Um den Gradienten auszugleichen strömt Natrium an der luminalen Seite durch Natriumkanäle (siehe Abbildung 1) in die Gangzellen. Die Chloridionen werden durch Chloridkanäle wie z. B. **Cystic Fibrosis Conductance Regulator (CFTR)**; vgl. Chloridkanal in Abbildung 1) und Bicarbonat-Chlorid-Austauschern (engl. *bicarbonat exchanger* = BCE in Abbildung 1) in der apikalen Membran von Gangzellen resorbiert (Catalán et al., 2010; A. M. L. Pedersen et al., 2018). Im Austausch gegen die Chloridionen wird Bicarbonat ins Lumen transportiert, wodurch ein hypotoner, beinahe pH-neutraler Speichel entsteht (A. M. L. Pedersen et al., 2018).

Die Voraussetzung für den Aufbau eines Ionengradienten und die gerichtete Speichelsekretion ins Lumen ist ein polarer Monolayer aus sekretorischen Zellen. Die Polarität der epithelialen Drüsenzellen wird durch Verbindungen zur Basalmembran und Zell-Zell-Verbindungen orchestriert und erhalten. Die Basalmembran liegt zwischen den epithelialen und mesenchymalen Zellen; sie trennt und verbindet die beiden Gewebe. Über Verbindungsmoleküle wie Integrine ist die Basalmembran direkt an die epithelialen Zellen gebunden und koordiniert deren Polarität (Daley et

al., 2012; Heinrich et al., 2022; Overeem et al., 2015; Yu et al., 2005). Bei gestörter Organisation der Basalmembran, wie dies bei an Sjögren-Syndrom Erkrankten beobachtet wurde, ist auch die Polarität der Speicheldrüsenzellen in Form einer Verschiebung des Zellkerns gestört (Goicovich et al., 2003; Molina, 2006). Schlussleisten (engl. *tight junctions* = TJ) und Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin verbinden die epithelialen Zellen an der basolateralen Seite zu einem polaren Monolayer (Alberts et al., 2021). Bei den Zell-Zell-Verbindungen zwischen azinären Zellen handelt es sich vorrangig um „leckende“ Schlussleisten (siehe Abbildung 1, engl. *leaky TJ* = TJL), die einen parazellulären Natriumstrom ermöglichen (Proctor, 2016). Die Schlussleisten zwischen Gangzellen hingegen lecken nicht, sondern sind dicht und verhindern den Strom von Wasser in basolaterale Richtung (siehe Abbildung 1, TJT). Dies trägt zur Flussrichtung des Speichels bei (Proctor, 2016).

1.4 Organogenese der Speicheldrüsen

Die Speicheldrüsenorganogenese setzt sich aus mehreren neben- und nacheinander ablaufenden Prozessen zusammen. Die wesentlichen Prozesse sind Spaltenbildung, Innervierung, Gangbildung, Endknospenbildung, die Entwicklung von Vorläuferzellen und die Bildung eines Drüsenlumens (Mattingly et al., 2015). Diese Vorgänge beruhen vorwiegend auf Interaktionen zwischen epithelialen und umgebenden mesenchymalen Zellen, räumlich und zeitlich koordinierter Präsenz von Wachstumsfaktoren, sowie EZM-Molekülen und der von ihnen auf die Zellen ausgeübten mechanischen Kraft (Ishida-Ishihara et al., 2020; Kashimata & Hayashi, 2018; Kusakabe et al., 1985; Nakanishi & Ishii, 1989; Sui et al., 2020).



Developmental processes, cell interactions, and signaling pathways involved in salivary gland organogenesis.

Abbildung 2: Entwicklungsprozesse, Zellinteraktionen und Signalwege, die an der Speicheldrüsenorganogenese beteiligt sind. Die abgebildeten Prozesse laufen neben- und nacheinander ab. Die untergeordneten Signalwege und Moleküle sind die Hauptakteure in dem jeweiligen Prozess. *Duct formation*: Gangbildung; *End bud formation*: Endknospenbildung; *Progenitor cells*: Vorläuferzellen; *Lumen formation*: Lumenbildung; *Cleft formation*: Spaltenbildung; *Innervation*: Innervierung. Aus Mattingly et al., 2015.

DIE ROLLE DER EZM IN DER ORGANOGENESE

Zur ordnungsgemäßen Morphogenese einer Speicheldrüse gehört ein ständiger Umbau der EZM, der Basalmembran, ihrer Verknüpfungen innerhalb und den Verbindungen zu den umliegenden Zellen (Chibly et al., 2022; Mattingly et al., 2015; Sequeira et al., 2010; Tucker, 2007). Besonders deutlich wird dies in der Spaltenbildung. Die Spaltenbildung ist einer der ersten und auch einer der wichtigsten Prozesse in der Entwicklung, da die verzweigende Morphogenese darauf beruht. Der Prozess der verzweigenden Morphogenese beschreibt die Entwicklung einer Epithelverdickung zu einer tubuloazinären Speicheldrüse. Spaltenbildung bezeichnet den Vorgang an der Stelle, an der sich eine Verzweigung bildet (siehe Abbildung 3).

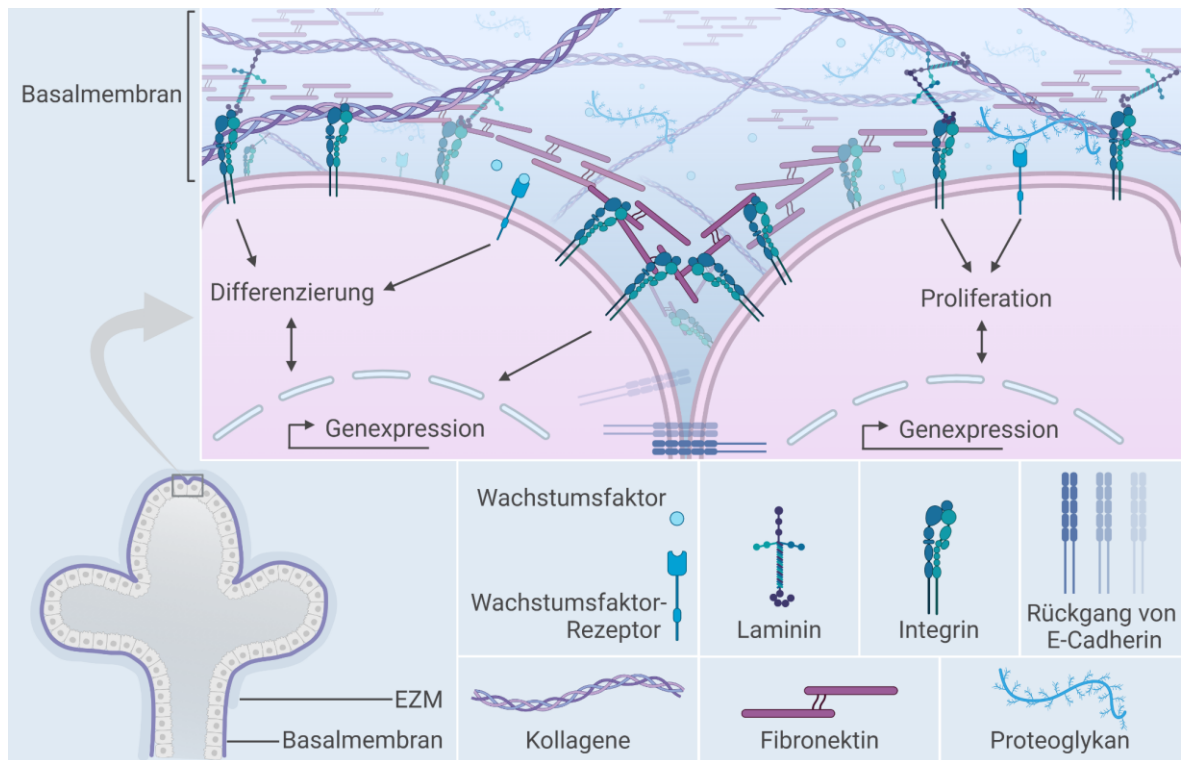


Abbildung 3: Prozesse an der EZM in der Spaltenbildung. Die Basalmembran (BM) liegt an epithelialen Zellen der sich entwickelnden Speicheldrüse; ihre Bestandteile Kollagen IV, Laminine und Fibronektin sind über Integrine an die Zellen gebunden. Bei der Spaltenbildung werden Zell-Zell-Verbindungen gelöst (z. B. Rückgang von E-Cadherin) und stattdessen mehr Verbindungen zwischen Fibronektin und Integrinen eingegangen (zentral im oberen Bild). Neben den Bindungen von EZM-Komponenten an Integrinen reguliert die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptoren die Genexpression, was zu Spaltenbildung, Proliferation und Differenzierung führt. Proliferation lässt Drüsenknospen und Gänge wachsen. Wachstumsfaktoren befinden sich frei oder an Proteoglykanen in der EZM und BM. Proteoglykane dienen sowohl als Speicher als auch als Ko-Faktoren für Wachstumsfaktoren. Wachstumsfaktor und -Rezeptor: z. B. FGF- oder EGF-Vertreter; Kollagene: v. a. Kollagen IV, I und III; Integrine: Heterotrimere aus α - und β -Untereinheit, z. B. Integrin $\alpha 6$, $\beta 1$; Laminine: Heterotrimere, relevante Untereinheiten z. B. Laminin $\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$ oder $\alpha 5$; Proteoglykan: z. B. Perlecan. Abbildung erstellt mit BioRender.com, adaptiert anhand von Sequeira et al., 2010.

Die Spaltenbildung beruht auf dem Wechsel der Zell-Zell-Verbindungen zu EZM-Zell-Verbindungen (Sequeira et al., 2010; S. Wang et al., 2021). Maßgeblich daran beteiligt sind Kollagene, Laminine, Heparansulfatproteoglykane (HSPG), Fibronektin und die Wachstumsfaktoren der FGF-Familie (Mattingly et al., 2015).

Eines der wichtigsten Moleküle bei der Spaltenbildung ist **Fibronektin** (Gen **FN1**; siehe Abbildung 3; (Larsen et al., 2006; Sakai et al., 2003; Sequeira et al., 2010; S. Wang et al., 2021)). Fibronektin ist ein Fibrillen-bildendes Glykoprotein, das sowohl Bindungsstellen für andere Fibronektin-Moleküle als auch für Kollagene, Heparine und Integrine hat (Heinrich et al., 2022; Pankov & Yamada, 2002).

Über Integrine verbindet Fibronectin die EZM mit Zellen (siehe Abbildung 3). An einer entstehenden Spalte bilden sich Fibronectin-Ansammlungen (Sakai et al., 2003). Direkt darunter liegend ist ein Rückgang von E-Cadherin zu beobachten, das ein wichtiges epitheliales Adhäsionsmolekül zur Zell-Zell-Verbindung darstellt. Während E-Cadherin zwischen den Zellen des epithelialen Monolayers eine essenzielle Verknüpfung darstellt, müssen zur Spaltenbildung diese Verbindungen gelöst werden. Zellen, die nur schwach durch Zell-Zell-Verbindungen mittels E-Cadherin verbunden sind, bevorzugen starke Zell-Matrix-Verbindungen wie Fokaladhäsionen (Bonnet et al., 2023; Sakai et al., 2003; S. Wang et al., 2021). Dadurch trennt die EZM die Zellen voneinander und eine Spalte bildet sich.

Ein weiteres Adhäsionsmolekül, das eine Rolle in der verzweigenden Morphogenese spielt, ist **Connexin 43** (Yamada et al., 2016). Connexin 43 ist erforderlich bei FGF-induzierten Signalkaskaden, die zu einer ordnungsgemäßen Proliferation in der Morphogenese beitragen.

Ebenfalls am Scheitelpunkt der sich verzweigenden Drüsenknospe (engl. *bud*) liegt **Kollagen III** (Nakanishi et al., 1988). Der Verdau von **Kollagen I** und **III** durch spezifische Kollagenasen führt zu reduzierter Spaltenbildung (Fukuda et al., 1988; Grobstein & Cohen, 1965; Nakanishi et al., 1986). Diese beiden Kollagenuntereinheiten tragen folglich in unverdauter Form zu einer ordnungsgemäßen Spaltenbildung bei. **Kollagen IV** hingegen ist nicht nur Hauptbaustein der Basalmembran, sondern kann auch als Botenstoff dienen. Wenn die Kollagen IV-Domäne NC1 von Membrantype-2-Matrixmetalloproteasen (MT2-MMP, Gen = MMP15) abgespalten wird, kann NC1 die verzweigende Morphogenese durch Bindung an Integrin $\beta 1$ regulieren (Rebustini et al., 2009). Diese Bindung aktiviert die Expression des FGF-Rezeptors 2b (FGFR2b). Die Signaltransduktion über den Rezeptor FGFR2b ist in der verzweigenden Morphogenese von Bedeutung (Lombaert et al., 2013; Steinberg et al., 2005). FGFR2b wird vorrangig in den epithelialen Zellen der sich entwickelnden Drüse exprimiert und fungiert dort als Rezeptor für FGF7 und FGF10. FGF7 erhöht die Expression von FGF1 und FGFR1b und stimuliert so die Zellproliferation der Drüsenknospe; FGF10 fördert die Zellproliferation am Ende des Ganges, sodass dieser sich verlängert (Steinberg et al., 2005). Die Wachstumsfaktoren der FGF-Familie werden vorrangig vom Mesenchym sezerniert und müssen durch die mesenchymale sowie epitheliale EZM/Basalmembran

diffundieren, um an ihren Wirkort, die epithelialen Zellen mit FGF-Rezeptoren zu gelangen (Hosseini et al., 2018).

Bei der Durchquerung der EZM treffen die Wachstumsfaktoren auf **Heparansulfat-proteoglykane (HSPG)** wie **Perlecan** und **Agrin** (Hallmann et al., 2022). HSPG dienen Wachstumsfaktoren als Speicher oder Ko-Rezeptoren und können darüber den Verlauf der verzweigenden Morphogenese beeinflussen (vgl. mit Abbildung 3: *Proteoglycan, Growth factor, Growth factor receptor*). Am Beispiel des HSPG Perlecan lassen sich diese Funktionen erläutern: spezifische modulierte Kohlehydratanhänge von Perlecan dienen als Speicher für FGF10, welches Spaltenbildung, Proliferation und Verzweigung fördert (Patel et al., 2008). Wenn durch Heparanase diese spezifischen Strukturen des Perlecans abgespalten werden, setzt dies FGF10 frei und die abgetrennten Strukturen dienen als Ko-Faktoren bei der Bindung des FGF10 an FGFR2b (Patel et al., 2007, 2008). Auf diese Weise wechselt die Funktion des HSPGs von Speicher zu Ko-Faktor. Die Wirkweise von Heparanase verdeutlicht die Relevanz von Proteasen in der verzweigenden Morphogenese: wie bereits MT2-MMP mit dem Abspalten der NC1-Domäne beeinflusst auch Heparanase-Aktivität durch Freisetzen eines Botenstoffs deutlich die Verzweigung der submandibulären Speicheldrüse (engl. *submandibulary gland* = SMG). Auch **Kollagen XVIII** weist Eigenschaften der HSPGs auf und wurde in der EZM der Speicheldrüse identifiziert (Halfter et al., 1998; O. N. Tran et al., 2022). Die Rolle von Kollagen XVIII in der Speicheldrüsenmorphogenese ist nicht vollumfassend studiert. In Studien zu Niere und Lunge wurde jedoch festgestellt, dass Kollagen XVIII über WNT-Signaltransduktion oder die Bindung an Integrine einen Einfluss auf die verzweigende Morphogenese hat (Lin et al., 2001; Rinta-Jaskari et al., 2023).

Laminine sind ebenfalls relevante Akteure in der verzweigenden Morphogenese und obligatorische Bestandteile der Basalmembran (Heinrich et al., 2022; Mattingly et al., 2015; Sequeira et al., 2010). Die Untereinheiten Laminin α 1 (**LAMA1**), Laminin γ 1 (**LAMC1**) und Laminin α 5 (**LAMA5**) fungieren in der Morphogenese als wichtige Linker zwischen EZM-Molekülen und Rezeptoren an der Zelloberfläche (siehe Abbildung 3; Durbeej et al., 2001; Kadoya et al., 1995, 1997; Kashimata & Gresik, 1997). In fötalen humanen Speicheldrüsen wird LAMC1 im Gegensatz zu adulten humanen Speicheldrüsen stark exprimiert (Saitou et al., 2020). Laminin-1, das Trimer aus Laminin α 1, β 1,

und $\gamma 1$, bindet über Integrin $\alpha 6$ (**ITGA6**, siehe Abbildung 3) an Zellen, die nahe der Basalmembran liegen (Kadoya et al., 1995). Der epitheliale Wachstumsfaktor (EGF, siehe Abbildung 3) erhöht die ITGA6-Expression. Ebenfalls durch EGF erhöht wird die Expression des Gens von **Nidogen 1** (**NID1**, (Kadoya et al., 1997)). Nidogen 1 ist ein ubiquitäres Linkermolekül der Basalmembran; zu seinen Bindungspartnern gehören Laminine und Kollagen IV (Kadoya et al., 2022). Die Nidogen 1-Laminin $\gamma 1$ -Interaktion ist essenziell für eine ordnungsgemäße Basalmembranbildung in der verzweigenden Morphogenese (Kadoya et al., 1997). EGF-Supplementierung könnte demnach von Vorteil bei der Etablierung eines zellulären Speicheldrüsenmodells aus Stammzellen sein.

1.5 Homöostase und Regeneration - Stammzellen der adulten Speicheldrüse?

Zellen, die die Homöostase sowie Regeneration der Speicheldrüsen gewährleisten, sind vielfältig. Es konnte bisher keine eindeutige Stammzellnische bzw. universale adulte Speicheldrüsenstammzellpopulation identifiziert werden und die Suche gestaltet sich kompliziert (Rocchi et al., 2021; Sui et al., 2020; Weng et al., 2019). Ein universaler Stammzellmarker, der in allen sich regenerierenden Geweben exprimiert wird, ist nicht bekannt. Die Mikroumgebung beeinflusst die Differenzierung adulter Zellen so immens, dass sie selbst *in vivo* trans- und de-differenzieren können (Merrell & Stanger, 2016). *In vitro*-Untersuchungen reißen die Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung, die einen großen Einfluss auf ihr Verhalten hat (EZM, Zell-Zell-Kontakte, Chemokine usw.; Weng et al., 2019). Nicht nur Stammzellen können in Zellkultur proliferieren; die artifiziellen Gegebenheiten verleiten auch differenzierte Zellen dazu, sich zu teilen und andere Gene zu exprimieren als *in vivo* (Rapoport et al., 2009).

Speicheldrüsenzellen haben generell eine geringe proliferative Aktivität: sie teilen sich weniger häufig als beispielweise Zellen der Darmschleimhaut. Die Art der Stammzellen in der Speicheldrüse ist nicht vergleichbar mit den Stammzellen, die aus dem Knochenmark oder schnell proliferierenden Geweben bekannt sind (Rocchi et al., 2021). Experimente mit „*label-retaining cells*“ (LRC; zu Deutsch: langsam proliferierende Zellen, die einen DNA-Marker bei Teilung behalten) geben zwar den Hinweis auf eine Vorläuferzellpopulation in den Schaltstücken der Gänge, die genauen Eigenschaften dieser Zellen sind aber unbekannt. Auch azinäre oder myoepitheliale Zellen besitzen

die Fähigkeit zur Homöostase zu proliferieren (Aure et al., 2015; May et al., 2018). Bei reversiblen Verletzungen wie der Obstruktion des Ausscheidungsgangs oder auch bei geringer Bestrahlung (zu Beginn der Behandlung) verkümmern zunächst besonders die azinären Zellen (Rocchi et al., 2021). Die Regeneration der azinären Zellen durch Proliferation derselben ist bis zu einem gewissen Schweregrad der Beschädigung möglich; Homöostase und leichte Regeneration beruhen auf Zellen derselben Abstammung (engl. *lineage-restricted*). Bei einer größeren Anzahl beschädigter Zellen, wie bei Strahlentherapie üblich, ist die Beschädigung nicht mit Proliferation azinärer Zellen allein zu beheben. Dann bedarf es der Plastizität von Gangzellen, die zu azinären Zellen differenzieren (Weng et al., 2018). Andere Speicheldrüsen-zellen sind auch in der Lage zu transdifferenzieren, dedifferenzieren und redifferenzieren (Rocchi et al., 2021; Weng et al., 2018). Außerdem wird angenommen, dass Ionozyten, ein kürzlich auch in Speicheldrüsengängen entdeckter Zelltyp, die Proliferation adulter epithelialer Zellen unterstützt (Mauduit et al., 2022). Dabei handelt es sich um einen über verschiedene Organe konservierten Zelltyp, der neben Eigenschaften von Vorläuferzellen auch die Fähigkeit zur Erhaltung der Ionenhomöostase besitzt (Horeth et al., 2023; Mauduit et al., 2022; Pou Casellas et al., 2023).

Homöostase und Regeneration der Speicheldrüse beruhen auf proliferativen, unterstützenden und plastischen Fähigkeiten verschiedener Speicheldrüsenzelltypen, nicht auf einer einzelnen Population adulter Stammzellen.

STAMMZELLMARKER NESTIN

Nestin ist als **Stammzellmarker** in neuronalen Zellen entdeckt worden und hat sich als Marker für Vorläuferzellen in weiteren Geweben etabliert (Cattaneo & McKay, 1990; Lendahl et al., 1990; Wiese et al., 2004). In der humanen Speicheldrüse ist Nestin als solcher Marker wenig erforscht und eher im Zusammenhang mit Krebs oder in artifizieller Kultur von Speicheldrüsenzellen betrachtet worden (Frahm, 2014; Pérez-Sayáns et al., 2021; Petschnik, 2011; Yanai et al., 2013). Die Nestin-Expression in gesunden murinen Speicheldrüsen konnte vor allem in Zellen lokalisiert werden, die, ähnlich wie myoepitheliale Zellen, um Azini und Gänge herum liegen (Do Valle et al., 2022). Nach Ligation von murinen Speicheldrüsen zeigt sich eine Erhöhung Nestin-positiver Zellen am verschlossenen Gang (Yokoyama, 2017). Unter artifiziellen, verletzungsähnlichen Bedingungen

scheinen auch humane Zellen, die Azini entspringen, in der Lage zu sein, Nestin zu exprimieren: Das Isolationsprotokoll für die in dieser Arbeit verwendeten Parotis-abgeleiteten Stammzellen (engl. *human parotid gland-derived stem cells* = hPDSCs) aus Azini ist adaptiert von einem Protokoll zur Zellisolation aus dem Pankreas und bringt reproduzierbar Nestin-positive Zellen mit Stammzeleigenschaften hervor (Kajahn et al., 2008; Kruse et al., 2004; Petschnik, 2011; Richter et al., 2013). **Nestin** spielt also sowohl in der Kultur der hPDSCs als auch in der murinen Speicheldrüse eine Rolle als Marker für Stammzellen oder Vorläuferzellen und wird in dieser Arbeit als solcher untersucht.

1.6 Modelle und Tissue Engineering der Speicheldrüse

Zur Forschung an Speicheldrüsen und speicheldrüsenassoziierten Krankheitsbildern werden Modelle benötigt, die die Speicheldrüse und ihre Physiologie sowie Pathophysiologie abbilden. Sowohl klassische Forschungswerkzeuge wie Tierversuche und Zelllinien als auch neu entwickelte Technologien wie Organ-Chips finden Einsatz in der Speicheldrüsenforschung.

TIERVERSUCHE

Versuchstiere bieten den Vorteil, die Gesamtheit eines Organismus mit all seinen verbundenen Geweben in Gesundheit wie Krankheit widerspiegeln zu können. Besonders zur Untersuchung der Folgen von Bestrahlung, der Regeneration der Speicheldrüse und möglicher regenerativer Therapien werden noch viele Tierversuche an Mäusen durchgeführt (Aure et al., 2015; Emmerson et al., 2018; Hong et al., 2022; Jeong et al., 2013; Lombaert et al., 2008; May et al., 2018; Pradhan-Bhatt et al., 2013; Shin, Hong, et al., 2018; Tanaka et al., 2018; Weng et al., 2018).

Diese Fragestellungen legen ein organismisches System zugrunde, das bisher nur durch Versuchstiere abgebildet werden konnte. Zelluläre Testsysteme bieten bereits jetzt erste Alternativen zu Tierversuchen, können aber noch nicht das gesamte System eines menschlichen Körpers abbilden (siehe Kapitel „Komplexe Speicheldrüsenmodelle – Matrigel, Mulden und Mikrofluidik; (Dehne & Marx, 2020)).

EX VIVO-KULTUR VON SPEICHELDRÜSENGEWEBE

Die Kultur von Organexplantaten bietet den Vorteil, die Komplexität eines Gewebes mit verschiedenen Zelltypen und seiner Struktur widerzuspiegeln. Außerdem lassen sich die Organe gezielt durch Supplemente oder Inhibitoren beeinflussen und die Testung neuer Wirkstoffe kann ohne langwieriges Tierleid während der Experimente erfolgen. Humanes Gewebe kann auch für *ex vivo*-Kulturen eingesetzt werden, ist jedoch nur limitiert verfügbar (Emmerson et al., 2017, 2018).

Den Vorteil der gezielten Beeinflussung machen sich auch Forschende zunutze, die die Entwicklung der Speicheldrüse untersuchen: in *ex vivo*-Kultur lassen sich embryonale SMG-Explantate unter Einfluss von Wachstumsfaktoren, EZM-Proteinen oder entsprechenden Proteasen und Inhibitoren weiterentwickeln (u. v. m. vgl. Kapitel Die Rolle der EZM in der Organogenese (Durbeej et al., 2001; Fukuda et al., 1988; Kadoya et al., 1995, 1997; Onodera et al., 2010; Sakai et al., 2003; Steinberg et al., 2005; S. Wang et al., 2021; Yamada et al., 2016)). Dies kann Aufschluss darüber geben, auf welche Weise gewisse Proteine an der verzweigenden Morphogenese beteiligt sind. Auch Informationen zur Regeneration in adulten Speicheldrüsen lassen sich durch *ex vivo*-Kulturen erlangen: Emmerson und Kollegium konnten durch *ex vivo*-Kultur von murinem und humanem Speicheldrüsenewebe cholinerge Stimulation und SOX2 als Regulatoren identifizieren, die für azinäre Differenzierung in fötalen und Regeneration in adulten Speicheldrüsen erforderlich sind (Emmerson et al., 2017, 2018).

Die Tierhaltung ist jedoch generell aufwendig und auch ohne das Leid durch Experimente selten artgerecht. Außerdem bleiben die Nachteile bestehen, dass Tiere für die *ex vivo*-Kultur sterben müssen und das Modell weder den gesamten Organismus noch humanes Gewebe abbildet. Humanes Gewebe für *ex vivo*-Kulturen hingegen ist sehr beschränkt verfügbar.

ADHÄRENT KULTIVIERTE SPEICHELDRÜSENZELLEN UND SPEICHELDRÜSENZELLINIEN

Zelllinien bieten durch einfache Kulturhandhabung, Verfügbarkeit und Einsatzmöglichkeit in Hochdurchsatzverfahren immer noch Vorteile gegenüber manchen hochentwickelten komplexen Speicheldrüsenmodellen. Außerdem stellen bereits einfache zelluläre Testsysteme eine Möglichkeit dar, Tierversuche zu manchen zellbiologischen Fragestellungen zu ersetzen.

Es gibt eine Reihe an murinen Zelllinien, die sowohl Gang- als auch azinäre Differenzierung zeigen (Rose et al., 2023). Diese Zellen spiegeln bereits viele relevante Eigenschaften wider: neuronale Stimulierbarkeit samt intrazellulärer Signaltransduktion, epitheliale Zellen in polarem Monolayer und sekretorische Granula. Keine der murinen Zelllinien kann jedoch die Komplexität der Speicheldrüsen vollends abbilden und Unterschiede zu humanen Speicheldrüsenzellen bleiben nicht auszuschließen.

Die wenigen aktuellen humanen Speicheldrüsenzelllinien umfassen nur Zellen, die aus Gängen oder Karzinomen abgeleitet wurden (Rose et al., 2023; Sato et al., 1984; Yanagawa et al., 1986). Azinäre Zellen sind für die Modellierung des Sekretionsmechanismus essenziell. Es ist bisher jedoch nicht gelungen, eine stabile humane azinär differenzierte Zelllinie zu etablieren (Rose et al., 2023). Primäre Zellen verändern in adhärenter Kultur auf Plastik ihre Genexpression, was zu Dedifferenzierung führen kann (Rapoport et al., 2009; Rose et al., 2023; Szlávik et al., 2008; B.-X. Zhang et al., 2015).

Durch die Notwendigkeit, immer wieder neue primäre Zellen zu generieren, entsteht eine Abhängigkeit von Explantaten, die nur limitiert zur Verfügung stehen. Die Kultur primärer Speicheldrüsenzellen in komplexeren Modellen zeigte größere Erfolge, die Expression azinärer Marker zu erhalten (Joraku et al., 2007; Ozdemir et al., 2017; Song et al., 2021; Srinivasan et al., 2017; Sui et al., 2020; Szlávik et al., 2008; S. D. Tran et al., 2005). Dazu gehörten auch die adhärente Kultur auf mit EZM-Proteinen beschichteten, strukturierten Oberflächen oder in Membraneinsätzen (Jang et al., 2015; Schramm et al., 2017; Soscia et al., 2013; Szlávik et al., 2008; S. D. Tran et al., 2005; B.-X. Zhang et al., 2015). Zhang und Kollegium zeigten, dass eine Substratbeschichtung mit Seidenfasern der Dedifferenzierung entgegenwirken kann (B.-X. Zhang et al., 2015). Primäre epitheliale Speicheldrüsenzellen, die auf Seidenfasern kultiviert wurden, hielten die Produktion, Einlagerung in Vakuolen und adrenerg stimulierte Sekretion von α -Amylase 1 besser aufrecht als solche Zellen, die auf herkömmlichen Plastiksubstrat kultiviert worden waren.

Die Methodik mit Membraneinsätzen eignet sich besonders gut, um die Integrität und Polarität eines epithelialen Monolayers und potenzielle Speichelsekretion zu unterstützen und zu testen. Dies kann beispielsweise durch Untersuchungen der Expression von Zell-Zell-Verbindungs-molekülen, trans- und parazellulärer Flüssigkeitsbewegungen und des transepithelialen Widerstands erfolgen. Außerdem ermöglichen Membraneinsätze die gezielte apikale und basale Stimulation und

Versorgung von Zellen. Die Behandlung und Strukturierung des Zellkultursubstrats, sowohl gewöhnlicher Petrischalen als auch von Membraneinsätzen, kann zur Erhöhung der Differenzierung der darauf kultivierten Zellen führen (Jang et al., 2015; Soscia et al., 2013). Dabei wird häufig auf EZM-Proteine oder Nanofasern zurückgegriffen.

Adhärenz Zellkulturen sind durch die große Kontaktfläche mit dem Substrat und die kleineren Kontaktpunkte mit anderen Zellen jedoch weit entfernt von *in vivo* ähnlichen Zuständen. Außerdem sind Zelllinien beschränkt auf einen Zelltyp und adhärenz primäre Zellkulturen mit mehreren Zelltypen sind limitiert in der räumlichen Organisation. Um kultivierte Zellen an natives Gewebe anzunähern, liegt die Kultur in dreidimensionalen Strukturen nahe.

KOMPLEXE SPEICHELDRÜSENMODELLE – MATRIGEL, MULDEN UND MIKROFLUIDIK

Wie an Prozessen der Morphogenese oder auch der Sekretion deutlich wird, sind komplexere Modelle erforderlich, um die Physiologie von Speicheldrüsen ausreichend abzubilden. Hochentwickelte Testsysteme sollten unterschiedliche Zelltypen, EZM-Bestandteile und die Polarität der epithelialen Zellen widerspiegeln. Nur sehr komplexe Testsysteme wie Multi-Organ-Chips bzw. Körper-Chips, die einen Organismus systemisch abbilden, könnten eine echte Alternative zu Tierversuchen darstellen (Dehne & Marx, 2020). Deshalb steht die Entwicklung komplexer Speicheldrüsenmodelle aktuell im Fokus der Forschung (Decarli, Mizukami, et al., 2022; Hajiabbas et al., 2022; Pierfelice et al., 2024; Rose et al., 2023).

Zellen für dreidimensionale Speicheldrüsenmodelle

Im Wesentlichen werden drei verschiedene Zellgrundlagen für dreidimensionale Speicheldrüsenmodelle verwendet: Murine Zellen, humane Stamm- und Vorläuferzellen jeglicher Art und primäre Zellen aus humanen Speicheldrüsen. Murine Zellen sind leicht verfügbar und wurden bereits erfolgreich in dreidimensionaler Kultur zu Speicheldrüsenmodellen differenziert (Athwal & Lombaert, 2019; Tanaka et al., 2018; Tanaka & Mishima, 2020; Yoon et al., 2022). Murine Speicheldrüsenmodelle eignen sich dazu, biologische Prozesse und Grundlagen zu untersuchen, die in Menschen ähnlich ablaufen, ohne auf humanes Gewebe angewiesen zu sein

(Athwal & Lombaert, 2019). Wie Tierversuche können Experimente mit tierischen Zellkulturen den menschlichen Körper und die darin ablaufenden Prozesse jedoch nur limitiert abbilden.

Humane Stamm- und Vorläuferzellen sind eine beliebte Zellgrundlage in der aktuellen Forschung. Der Einsatz klassischer embryonaler Stammzellen (engl. *human embryonal stem cells* = hESCs) ist aus ethischen Gründen zu vermeiden und findet nur sehr limitiert Anwendung. Deshalb werden adulte humane Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen (engl. *human induced pluripotent stem cells* = hiPSCs) isoliert, erzeugt, gezüchtet und erforscht. Vielseitige adulte humane Stammzellen sind mesenchymale Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells* = MSCs), welche auch in der Entwicklung von Speicheldrüsenmodellen Einsatz finden (Adine et al., 2018; O. N. Tran et al., 2022). MSCs können aus verschiedenen mesenchymalen Geweben wie z. B. dem Knochen- oder Zahnmark isoliert werden (Adine et al., 2018; Baniebrahimi et al., 2019). Deshalb stellen sie eine gut verfügbare Zellquelle dar. Adine und Kollegium konnten humane Stammzellen aus dem Zahnmark erfolgreich einsetzen, um ein Speicheldrüsenmodell zu entwickeln (Adine et al., 2018). Wachstumsfaktoren aus der Speicheldrüsenmorphogenese oder EZM-Proteine aus der Speicheldrüse regen die MSCs zur Differenzierung in Richtung epithelialer Speicheldrüsenzellen an (Adine et al., 2018; O. N. Tran et al., 2022).

Am häufigsten werden primäre Zellen, die aus Speicheldrüsenexplantaten isoliert wurden, in der Entwicklung humaner dreidimensionaler Speicheldrüsenmodelle eingesetzt (Joraku et al., 2007; Ozdemir et al., 2017; Song et al., 2021; Srinivasan et al., 2017; Sui et al., 2020). Oft weisen solche Zellen nach Inkulturnahme Eigenschaften von Stammzellen auf und werden als Speicheldrüsenstammzellen, Speicheldrüsen-abgeleitete Stammzellen, glanduläre Stammzellen, adulte Stammzellen oder Progenitoren/Vorläuferzellen aus Speicheldrüsen bezeichnet (Hong et al., 2022; Jeong et al., 2013; Ozdemir et al., 2017; Petschnik, 2011; Sui et al., 2020; Yi et al., 2016). Auch in dieser Arbeit werden primäre Zellen verwendet, die aus Speicheldrüsen isoliert wurden und stammzellartige Eigenschaften aufweisen: humane Parotis-abgeleitete Stammzellen (engl. *human parotid gland-derived stem cells* = hPDSCs; (Gorjup et al., 2009; Petschnik, 2011; Rotter et al., 2008)). hPDSCs lassen sich kryokonservieren, bleiben über viele Passagen proliferativ und behalten lange die Expression des Stammzellmarkers Nestin bei. Somit bieten hPDSCs den Vorteil, bei Bedarf

vermehrt oder aufgetaut werden zu können, um in großer Zahl in 3D-Kultur eingesetzt werden zu können.

Formgebung für gewebetypische Speicheldrüsenmodelle

Es gibt viele Ansätze, Zellen in dreidimensionaler Form zu kultivieren, um die Kulturbedingungen an ein vielzelliges, strukturiertes Gewebe anzugleichen. Eine Form von Struktur bei adhärent kultivierten Zellen gibt bereits die adhärente Kultur in Membraneinsätzen, die im Abschnitt „Adhärenz kultivierte Speicheldrüsenzellen und Speicheldrüsenzelllinien“ beschrieben wurde (Pradhan-Bhatt et al., 2013; Schramm et al., 2017; S. D. Tran et al., 2005). Die Kultur in Membraneinsätzen ermöglicht polare Monolayer aufzubauen und die Implementierung von Mikrofluidik, jedoch nicht Azinus- und Gang-Strukturen mitsamt Bindegewebe abzubilden.

Eine simple Methode zur dreidimensionalen Zellkultur von Drüsenzellen sind hängende Tropfen (Bécavin et al., 2016; Kruse & Fuhr, 2007). Die Sphäroidkultur in hängenden Tropfen beruht darauf, dass sich Zellen in einem hängenden Suspensionstropfen durch die Schwerkraft getrieben zu Sphäroiden aggregieren. Bécavin und Kollegium konnten in hängenden Tropfen Mikrogewebe aus embryonalen murinen SMG herstellen (Bécavin et al., 2016). Die Sphäroidkultur in hängenden Tropfen bedarf keiner speziellen Utensilien und ist kostengünstig, jedoch ist die Initiation der 3D-Kultur arbeitsaufwendig und die Ausbeute gering (Ouyang et al., 2015).

Mittlerweile gibt es fortgeschrittene technologische Möglichkeiten zur Herstellung dreidimensionaler Organmodelle wie 3D-Druck von Zellkulturutensilien und Bioprinting. Unter dem Begriff Bioprinting versammeln sich aktuelle Techniken der additiven Fertigung mit organischen Substanzen sowie lebendigen Zellen. Diese Techniken machen sich beispielsweise magnetische Nanopartikel zunutze: Die biokompatiblen Partikel werden in Zellen eingelagert, welche dann in einem Magnetfeld aggregieren (Adine et al., 2018). Ein weiterer Bioprinting-Ansatz ist, 3D-Druck zur gewebeähnlichen Anordnung von organischen Substanzen und Zellen zu nutzen (Y. Yin et al., 2023). Yin und Kollegium sind in der Lage ein Modell aus Hydrogel und Speicheldrüsenzellen zu drucken, das in seiner Architektur dem einer tubuloazinären Drüse ähnelt. Diese Architektur erlaubt dem System Mikrofluidik zu integrieren. Mikrofluidische Systeme können Nährstoffe und Sauerstoffe zuführen sowie Metaboliten und Sekret abführen; also die Dynamik von Blut- und Lymphgefäßen sowie des Drüsenlumens abbilden. Ein multizelluläres Testsystem mit

implementierter Mikrofluidik, das sowohl Gewebestrukturen als auch -funktionen widerspiegeln kann, wird auch als Organ-Chip bezeichnet (Ingber, 2022). Tierversuche sind bislang die einzige Möglichkeit Regeneration der Speicheldrüse in einem organismischen System zu testen. Die Etablierung von Multi-Organ-Chips bzw. ihre Weiterentwicklung zu Körper-Chips stellen erstmals eine systemische Alternative zu Tierversuchen dar.

Neben den simplen oder komplex-technologisierten Herangehensweisen gibt es zwei, die sehr häufig zur Etablierung dreidimensionaler Speicheldrüsenmodelle verwendet werden: [1] die Kultur in Hydrogelen wie Matrigel, die die EZM-Umgebung im Gewebe widerspiegeln sollen, und [2] die Sphäroidkultur in Mikromulden.

Hydrogele

Viele hochentwickelte Organoide, die wichtige Eigenschaften der Speicheldrüse aufweisen, beruhen auf der Kultur mit Matrigel (Joraku et al., 2007; Pradhan et al., 2009; Sui et al., 2020; Yoon et al., 2022). Matrigel besteht aus über 1800 Proteinen, darunter EZM-Moleküle und Wachstumsfaktoren; es ist jedoch ein nicht vollständig definiertes Gemisch, das aus murinen Sarkomzellen stammt (Hughes et al., 2010). Das macht Organoide, die in Matrigel kultiviert wurden, für den Einsatz in regenerativen Therapien unbrauchbar (Kozłowski et al., 2021).

Der Vorteil von Matrigel ist, dass es den Zellen eine Umgebung bietet, die viele *in vivo*-ähnliche EZM-Moleküle und Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren enthält. Die Betrachtung speicheldrüsen-spezifischer EZM-Proteine kann Aufschluss darüber geben, welche Moleküle in einem definierten Hydrogel enthalten sein müssen, das äquivalente Kultur- und Differenzierungserfolge wie Matrigel ermöglicht. Tran et al. haben dazu azellularisierte EZM muriner SMG mittels Massenspektrometrie analysiert (O. N. Tran et al., 2022). Die Forschungsgruppe konnte EZM-Proteine der Speicheldrüse identifizieren, die die Differenzierung von MSCs zu epithelialen Speicheldrüsenzellen unterstützen (O. N. Tran et al., 2022). Um dieses Wissen zu erweitern, wäre es sinnvoll die EZM-Proteine humaner Speicheldrüsen zu identifizieren, sowohl in fötalen als auch in adulten Entwicklungsstadien. Saitou et al. haben eine große Studie zum Transkriptom der fötalen und adulten großen Speicheldrüsen angefertigt (Saitou et al., 2020). Obwohl der Fokus auf den Genen sezernierter Proteine lag, gibt die Studie auch Aufschluss zu fötalen EZM-Proteinen: Unter den stark in fötalen Speicheldrüsen exprimierten Genen befinden

sich EZM-Vertreter wie **Fibrillin 1 (FBN1)**, **Laminin γ 1** (Gen **LAMC1**), die Kollagenuntereinheiten $1\alpha 1$, $1\alpha 2$, $3\alpha 1$, $4\alpha 1$, $5\alpha 1$ und $5\alpha 2$ sowie die Proteoglykane **Perlecan** und **Lumican** (Gen **LUM** Saitou et al., 2020).

Eine weitere Herangehensweise zur Identifizierung differenzierungsfördernder EZM-Proteine ist ihr Einsatz in definierten Hydrogelen für Sphäroidkultur (Hosseini et al., 2018; Pradhan et al., 2009; Srinivasan et al., 2017). Grundlage bieten Erkenntnisse zur Rolle der jeweiligen EZM-Moleküle in der verzweigenden Morphogenese. Pradhan und Kollegium konnten zeigen, dass die Kultur in einem definierten Hydrogel mit Perlecan vergleichbare Ergebnisse erzielte wie die Kultur in Matrigel (Pradhan et al., 2009). Ebenso konnten in definierten Laminin-111-Hydrogelen mit FGF2-Supplementierung AQP5-positive Speicheldrüsenorganoide kultiviert werden (Hosseini et al., 2018).

Um die Kulturbedingungen noch weiter an den *in vivo*-Zustand anzugleichen, werden dem Kulturmedium Wachstumsfaktoren zugesetzt, die nachweislich eine Rolle in der Speicheldrüsenorganogenese spielen (Adine et al., 2018; Hosseini et al., 2018; Lombaert et al., 2008; Song et al., 2021; Srinivasan et al., 2017). Manche Protokolle passen die Supplementierung einem zeitlichen Ablauf an, um die zeitliche Abfolge der Morphogenese nachzuempfinden (Adine et al., 2018; Yoon et al., 2022). Diese Supplemente wie EGF und FGF-Vertreter werden auch in Matrigel-basierten Kulturmethoden erfolgreich eingesetzt (Joraku et al., 2007; Sui et al., 2020; Yoon et al., 2022). Da Matrigel aber bereits Wachstumsfaktoren enthält, lässt sich nicht abschließend sagen, ob es die definiert zugesetzten Wachstumsfaktoren sind, die eine Wirkung auf die Entwicklung der Sphäroide hatten (Hughes et al., 2010).

Mikromulden

Die zweite häufig verwendete Technik zur Herstellung von Sphäroiden ist die Kultur in Mikromulden (Birenboim et al., 2013; Decarli, Mizukami, et al., 2022; Hong et al., 2022; Shin, Hong, et al., 2018). Mikromulden bieten den Zellen zwar keine EZM-Strukturen wie die direkte Kultur in Hydrogelen, viele Zellen zeigen aber dennoch die Fähigkeit, sich darin zu aggregieren und Organoide zu bilden (Decarli, De Castro, et al., 2022). Das Prinzip erinnert an hängende Tropfen: die Zellen werden von der Schwerkraft in die Mulden gezogen, können dort jedoch nicht am Boden adhären oder ins Gel migrieren und adhären stattdessen aneinander. Mikromulden-Platten

können im Vergleich zu händisch gesetzten hängenden Tropfen im Deckel einer Petrischale ein Vielfaches an Mulden auf geringerer Fläche aufweisen (Bécavin et al., 2016; Decarli, Mizukami, et al., 2022; Kruse & Fuhr, 2007). Das macht die Kultur in Mikromuldenplatten besonders gut in Hochdurchsatzverfahren einsetzbar. Ein weiterer Vorteil der Sphäroidkultur in Mikromulden ist, dass die Größe der Sphäroide beeinflussbar ist (Decarli, Mizukami, et al., 2022). Durch die Größe der Mulden lässt sich der Durchmesser der Sphäroide vorgeben, der für die Vitalität und Physiologie der Sphäroide von Bedeutung ist. Je größer der Durchmesser, desto weniger Sauerstoff und Nährstoffe gelangen durch Diffusion zum Sphäroidkern. Außerdem kann es von Vorteil sein, uniforme kugelförmige Sphäroide zu verwenden, um bei zytotoxischen Tests und der Testung neuer bioaktiver Substanzen die Variabilität einzuschränken (Decarli, De Castro, et al., 2022; Leung et al., 2015; Zanoni et al., 2016).

Eine Gruppe Forschender um und mit Won-Gun Koh hat ein Speicheldrüsenmodell in Mikromulden etabliert und stetig weiterentwickelt (Hong et al., 2022; Lee et al., 2010; Shin et al., 2016; Shin, Hong, et al., 2018; Shin, Lee, et al., 2018). Bei den Zellen, die diese Forschungsgruppe verwendet, handelt es sich um Einzelklone aus primären murinen und humanen Zellen mit Stammzeleigenschaften (Yi et al., 2016). Die Mikromulden liegen in Hydrogel, ihr Boden besteht jedoch aus elektrisch gesponnenen Nanofasern. Die Zellen adhären nur an den porösen Matrizen aus Nanofasern und bilden dort uniforme Speicheldrüsensphäroide. Diese Art der Kultur zeigt eine höhere Effizienz als die Kultur in Matrigel: pro eingesetzte Zellen entstehen mehr Sphäroide (Shin, Hong, et al., 2018). Die Herstellung der Mikromulden-Platten bedarf eines Electrospinners und weiterer technischer Ausstattung. Es gibt andere Methoden Mikromulden-Platten herzustellen, die keine außergewöhnliche Laborausstattung erfordern (Birenboim et al., 2013; Decarli, Mizukami, et al., 2022; Ozdemir et al., 2017).

Eine Möglichkeit Mikromulden-Platten mit simplen Methoden und Materialien herzustellen ist, Agarose in Polydimethylsiloxan-Formen (PDMS-Formen) zu gießen (Birenboim et al., 2013). Dieses Verfahren wurde nach dem Protokoll von Panzer in dieser Arbeit angewendet (Panzer, 2023).

Mikromulden bieten durch ihre Öffnung die Möglichkeit, zeitversetzt Ko-Kulturen anzufertigen (Ozdemir et al., 2017). Ozdemir und Kollegium waren in der Lage, Ko-Kulturen von Speicheldrüsensphäroiden mit humanen myoepithelialen Zellen in Agarose-Mikromulden-Platten

(AMP) zu etablieren (Ozdemir et al., 2017). Nach der Bildung eines kompakten Sphäroids kann eine zweite Zellschicht darüber gesät werden, welche aus Zellen besteht, die auch in der Histologie der Speicheldrüse an epitheliale Drüsenzellen anschließen. Beispielsweise könnten neuronale oder myoepitheliale Zellen die Ähnlichkeit der Sphäroide zum nativen Gewebe erhöhen und somit auch die Funktionalität der Sphäroide verstärken.

Song und Kollegium verbinden die beiden beliebtesten Methodiken, indem sie die Mulden mit Polyethylenglykol-Hydrogel füllen (Song et al., 2021). Die Zellen sind immobilisiert, sodass Mikrofluidik implementiert werden kann: ein weiteres Beispiel für einen Speicheldrüsen-Organ-Chip.

1.7 Motivation und Ziel der Arbeit

Wie bereits oben beschrieben, erfüllt Speichel wichtige Funktionen zur Erhaltung der Gesundheit und Lebensqualität. Erkrankungen der Speicheldrüse sowie die Nebenwirkungen von Therapien anderer Krankheiten können den Speichelfluss und somit die Lebensqualität vieler Betroffener beeinträchtigen. Die häufigste Speicheldrüsenerkrankung ist obstruktive Sialadenitis, eine Entzündung der Speicheldrüse, der ein Verschluss des Ausscheidungsgangs vorangeht. Dieser Verschluss ist meist auf Sialolithiasis zurückzuführen, die Bildung von Konkrementen, auch Speichelsteine genannt (Ogle, 2020). Obstruktive und entzündliche Speicheldrüsen-erkrankungen gehen oft miteinander einher, da fehlende Spülung des Ausscheidungsgangs und der Mundhöhle Infektionen begünstigt. Infolge des Verlusts von regulärem Speichelfluss können Karies und Verletzungen der Mundschleimhäute auftreten. Die Fähigkeit, diese Verletzungen zu heilen, ist geringer und das Risiko einer Infektion erhöht sich, da die im Speichel enthaltenen Wachstumsfaktoren, Immunglobuline und antibakteriellen Bestandteile fehlen. Infektionen führen zu Mundgeruch, die den erkrankten Personen unangenehm im Kontakt mit anderen Menschen sein können. Nicht zuletzt führt Mundtrockenheit zu Schmerzen beim Sprechen und Schlucken, was nicht nur im Kontakt zu anderen Menschen sondern sogar auf die Ernährung der erkrankten Person weitreichende Folgen haben kann.

Sekretorische Störungen der Speicheldrüsen können diverse Ursachen haben. Die am häufigsten zugrundeliegenden Ursachen sind das Sjögren-Syndrom und Therapien vorausgehender

Erkrankungen: xerogene Medikamente und Strahlentherapie zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren (Ogle, 2020). Das Sjögren-Syndrom ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung, die u. a. mit Speicheldrüsenschwellungen und Mundtrockenheit einhergeht. In späterem Stadium führt die Autoimmunerkrankung zum Untergang der sekretorischen Zellen der Speicheldrüse (Lenarz & Boenninghaus, 2012).

Beispiele für xerogene Medikamente sind Psychopharmaka und Sympathomimetika, also Pharmazeutika, die Einfluss auf das Nervensystem haben (Lenarz & Boenninghaus, 2012; Tan et al., 2018). Eine Metaanalyse zu xerogenen Medikamenten ergab, dass besonders antimuskarinerge Mittel gegen Blaseninkontinenz, aber auch Antidepressiva und Psycholeptika Mundtrockenheit bei älteren Behandelten begünstigen (Tan et al., 2018). Dies ist von besonderer Bedeutung, da gerade ältere Menschen häufig auf solche Medikamente angewiesen sind, aber auch bereits durch altersbedingte Faktoren ein erhöhtes Risiko für Mundtrockenheit aufweisen. Denn die histologische Zusammensetzung der Speicheldrüsen verändert sich im Alter: der Fett- und Bindegewebsanteil am Volumen der Drüsen nimmt zu, während der Anteil der sekretorischen Zellen abnimmt (Scott et al., 1987; Vissink et al., 1996). Somit verlieren die Speicheldrüsen die funktionserfüllenden Zellen im Alter. Im Hinblick auf eine alternde Bevölkerung ergibt sich daraus eine starke Motivation, ein Speicheldrüsenmodell und neue Therapien zur Regeneration von Speicheldrüsen zu entwickeln.

Kopf-Hals-Tumor ist ein Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe an Tumoren. Weltweit sind Kopf-Hals-Tumore die siebthäufigste Krebsart (mehr als 660.000 Neuerkrankungen im Jahr 2020) und die Tendenz der Neuerkrankungen in Industriestaaten ist steigend (Gormley et al., 2022). Die Strahlentherapie zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren führt bei 80 % der Überlebenden zu Mundtrockenheit (X. Wang & Eisbruch, 2016). Die Bestrahlung beschädigt nicht nur die Krebszellen, sondern besonders auch azinäre Zellen, die bei anhaltender Therapiedauer nicht mehr in der Lage sind, zu regenerieren. Ohne die sezernierenden Zellen bleibt der Speichelfluss aus. Selbst wenn diese Menschen also ihre Krebserkrankung überleben, besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass sie nach der Genesung in ihrer Lebensqualität beeinträchtigt bleiben.

Die Notwendigkeit für ein funktionales Speicheldrüsenmodell und regenerative Therapien der Speicheldrüsen ist deutlich erkennbar. Die aktuellen Modelle decken den Bedarf noch nicht für jegliche Fragestellungen und erforderlichen Anwendungen ab. Besonders groß ist die Notwendigkeit

von systemischen Alternativen zu Tierversuchen, um Tierversuche zur Entwicklung von Humanarzneimitteln obsolet zu machen. Obwohl das Arzneimittelgesetz die systematische Suche nach einer Alternativmethode vorschreibt, bedarf die Zulassung neuer Arzneimittel in Deutschland noch der Testung an Tieren (Arzneimittelgesetz (AMG), 2023; Sachstand zu Tierversuchen und tierversuchsfreien Alternativmethoden, 2020). In den Vereinigten Staaten von Amerika ist es mittlerweile erlaubt, in klinischen Studien potenzielle Medikamente zu testen, die zuvor nicht in Tierversuchen sondern durch Alternativmethoden untersucht wurden (Wadman, 2023). Die Europäische Arzneimittelagentur sieht noch Bedarf an Fortschritten in der Entwicklung von Alternativen („Europäische Arzneimittelbehörde will noch nicht auf Tierversuche verzichten“, 2023). Diese Gesetzgebungen geben alle den Anlass, an alternativen Methoden zu forschen, neue Testsysteme zu etablieren und vorhandene stetig zu verbessern. Viele Forschende verfolgen bereits das 3R-Prinzip: Replace, Reduce, Refine (zu Deutsch „Ersetzen, Reduzieren, Verfeinern“). Tierversuche sollen vermieden, also reduziert oder z. B. durch zelluläre Testsysteme ersetzt werden. Wenn dies nicht möglich ist, sollen die Bedingungen des Tierversuchs verfeinert werden (*3R-Forschung*, 2023). Nicht alle biologischen Prozesse laufen in Tieren auf dieselbe Weise wie im Menschen ab. Es bedarf also nicht nur aus ethischen Gründen Alternativen zum Tierversuch.

ZIELSETZUNG

Das übergeordnete Ziel der Arbeit war es, ein zelluläres Speicheldrüsenmodell aus humanen Parotis-abgeleiteten Stammzellen (hPDSCs) zu entwickeln, das einen Vorteil gegenüber den bereits bestehenden Zellkulturen, Modellen und Testsystemen der Speicheldrüsen aufweist.

Zu diesem Zweck wurde zunächst evaluiert, welche Medienzusammensetzung eine speicheldrüsen-spezifische Genexpression in den hPDSCs fördert. Dazu wurden frisch isolierte hPDSCs in serumreduziertem und serumfreiem Medium kultiviert, das in der Differenzierung zu epithelialen Schweißdrüsenzellen erste Erfolge gezeigt hatte (Ertongur-Fauth, 2017). Mit dem Ziel Prozesse der Speicheldrüsenmorphogenese zu unterstützen, wurde beiden Medien der epitheliale Wachstumsfaktor EGF (engl. *epithelial growth factor*) zugesetzt, der eine wichtige Rolle in der verzweigenden Morphogenese spielt und bereits in anderen zellulären Speicheldrüsenmodellen erfolgreich gewirkt hatte (vgl. Kapitel „Modelle und Tissue Engineering der Speicheldrüse“).

Als Nächstes sollte mit den besagten Zellen und Medien ein dreidimensionales zelluläres Speicheldrüsenmodell etabliert werden, das sich ohne den Einsatz von Matrigel, anderen xenogenen EZM-Proteinen und komplexen Techniken kultivieren lässt. Dazu wurden hPDSCs in Agarose-Mikromulden-Platten (AMP) kultiviert, in denen sich einfach, raum- und materialsparend viele Sphäroide generieren lassen. Anhand der entstandenen hPDSC-Sphäroide ließ sich untersuchen, wie sich die Zell-Zell-Verbindungen sowie die Abwesenheit von Zellkulturplastik oder EZM-Ersatz auf die Genexpression der hPDSCs auswirkten.

Zuletzt wurden die globalen Genexpressionsveränderungen miteinander verglichen, die mittels chemischer Stimulation durch Mediumbestandteile und die mittels komplexer Stimulation durch Kultur in dreidimensionalen Zellverbänden entstanden sind. Der Fokus lag darauf, in den Genexpressionsänderungen Anzeichen für das Potenzial zu finden, die hPDSCs zu Speicheldrüsenzellen zu differenzieren. Dazu wurde die gepoolte RNA von hPDSCs aus den unterschiedlichen Kulturen in einer Transkriptomanalyse sequenziert und in einer differenziellen Genexpressionsanalyse (DEA) verglichen. Auf diese Weise sollte evaluiert werden, welche Kulturkonditionen die hPDSC am stärksten dabei unterstützen, ein Genexpressionsprofil von Speicheldrüsenzellen zu erlangen und somit Potenzial für ein Speicheldrüsenmodell aufzuweisen.

Die Ergebnisse der DEA erweiterten die Arbeit um ein Ziel: Das *Enrichment* wies besonders auf starke Veränderungen in der EZM hin. Da die EZM eine große Rolle in der verzweigenden Morphogenese von Speicheldrüsen spielt, wurde anhand des Expressionsmusters der EZM-Gene untersucht, in welchem Differenzierungsstatus sich die hPDSC-Sphäroide befanden. Die Erkenntnisse sollten dabei helfen, Maßnahmen zur Differenzierung der hPDSC-Sphäroide zu einem funktionalen Speicheldrüsenmodell zu treffen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 1: Liste der Chemikalien, Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Hergestellt/vertrieben von
Accutase	Life Technologies, USA
Agarose (NEEO Ultra-Qualität)	Carl Roth, Deutschland
Amphotericin B	Merck Millipore, USA
Bovines Hypophysenextrakt (BPE)	Life Technologies, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH, Deutschland
Cell-Tak™, Zell- und Gewebekleber	Corning, USA
Kollagenase NB 8	Nordmark Pharma GmbH, Deutschland
DMEM (4,5 g/L D-Glukose, L-Glutamin)	Life Technologies, USA
DMEM/F12	Life Technologies, USA
DMSO	SigmaAldrich, USA
Eindeckmedium Vectashield	Biozol, Deutschland
FKS (LOT 42Q4052K)	Life Technologies, USA
Gentamycin	Merck Millipore, USA
Glyzerin	Carl Roth, Deutschland
KSFM	Life Technologies, USA
L-Glutamin	Merck Millipore, USA
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Deutschland
PBS (Dulbecco's, ohne Calcium und Magnesium)	Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin	Merck Millipore, USA
rhEGF	Promega, USA
rhEGF (KSFM-Kit)	Life Technologies, USA
Ringerlösung	Fresenius Kabi AG, Deutschland

Bezeichnung	Hergestellt/vertrieben von
Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services GmbH, Deutschland
SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Chemical, USA
TE-Puffer	AppliChem GmbH, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland
Triton™-X100	SigmaAldrich, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Merck Millipore, USA
Tween® 20 (Polysorbat)	VWR, USA
Vectashield Eindeckmedium	BIOZOL Diagnostics Vertrieb GmbH, Deutschland
Ziegennormalserum	Vector Laboratories, USA

2.2 Kits

Tabelle 2: Liste der Kits für die Molekularbiologie.

Bezeichnung	Hergestellt/vertrieben von
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Inc. Headquarters, USA
NucleoSpin Mini RNA-Isolation	Macherey-Nagel, Deutschland
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	QIAGEN, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Deutschland
Direct-zol™ RNA Microprep	ZYMO RESEARCH Corporation, USA

2.3 Primer

Alle Primer wurden passend zum QuantiFast SYBR Green PCR-Kit bei QIAGEN in lyophilisierter Form erworben und in TE-Puffer gelöst.

Tabelle 3: Liste der verwendeten QuantiTect-Primer. Erläuterungen zu den Markern im Glossar und in Tabelle 16.
*RPS18 wurde als Referenzgen verwendet.

Gen	Amplikonlänge	Schmelztemperatur	Herstellerbezeichnung
AMY1A	122 bp	80,0 °C	Hs_AMY1A_1_SG
ANO1	92 bp	79,5 °C	Hs_ANO1_1_SG
AQP5	189 bp	87,5 °C	Hs_AQP5_1_SG
CASP3	147 bp	81,5 °C	Hs_CASP3_1_SG
CFTR	118 bp	79,0 °C	Hs_CFTR_1_SG
CHRM3	121 bp	80,0 °C	Hs_CHRM3_2_SG
MKI67	86 bp	78,5 °C	Hs_MKI67_1_SG
NES	77 bp	79,0 °C	Hs_NES_1_SG
RPS18*	61 bp	79,5 °C	Hs_RPS18_1_SG

2.4 Antikörper

Tabelle 4: Liste der Primärantikörper zur immunhistochemischen Färbung.

Zielepitop	Herkunft	Klonalität	Verdünnung	IgG	Hergestellt/ vertrieben von
Aquaporin 5	Maus	monoklonal, D7	1:500	IgG1	Santa Cruz Biotechnology, USA
CHRM3	Kaninchen	polyklonal	1:600	-	Sigma Aldrich, USA
Kollagen IV	Kaninchen	polyklonal	1:250	-	Abcam, Vereinigtes Königreich
Nestin	Maus	monoklonal, 10C2	1:200	IgG1	Merck Millipore, USA
TMEM16A	Maus	monoklonal, DG1/447	1:500	IgG1	Abcam, Vereinigtes Königreich

Tabelle 5: Liste der Isotypkontrollen zur Spezifizierung der Primärantikörper.

IgG-Klasse	Herkunft	Verdünnung	Hergestellt/vertrieben von
IgG1	Maus		Santa Cruz Biotechnology, USA

Tabelle 6: Liste der Sekundärantikörper mit konjugiertem Fluophor.

Reaktivität	Konjugiertes Fluophor	Verdünnung	Herkunft	Hergestellt/vertrieben von
Kaninchen	Cy3	1:400	Ziege	Dianova GmbH, Deutschland
Kaninchen	FITC	1:200	Ziege	Dianova GmbH, Deutschland
Maus	Cy3	1:400	Ziege	Dianova GmbH, Deutschland

2.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Liste des Verbrauchsmaterials.

Bezeichnung	Hergestellt/vertrieben von
96-well-PCR-Platte samt Verschlussfolie	Bio-Rad, USA
Bakteriologische Schale (55 mm, 90 mm)	Carl Roth, Deutschland
Bechergläser (20-100 ml)	Carl Roth, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-20 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Deutschland
CUTFIX Einwegskalpell (Fig. 23)	B. Braun, Deutschland
Glaspasteurpipetten, 230 mm	VWR, USA
Glaspipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	VWR, USA
Kryoröhrchen, 2 ml	TPP, Schweiz
Petrischale, 120 x 120 mm	Greiner, Österreich
Pipettenspitze (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, USA

Bezeichnung	Hergestellt/vertrieben von
Serologische Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
PDMS-Form für Agarose-Multiwell-Platten (AMP)	Eigene Herstellung
Spritzenfilter, 0,22 µm	Carl Roth, Deutschland
Sterican®-Kanüle, 20G, 0,9 x 40 mm	Carl Roth, Deutschland
Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²)	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten (6 und 96 Kalotten)	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen (22,1 cm ² , 60,1 cm ²)	TPP, Schweiz
Propidiumiodid-Einwegkassetten NucleoCassette™	ChemoMetec, Dänemark
µ-Dish 35 mm Zellkulturschalen	Ibidi, Deutschland
Nylonmembran	Sefar, Schweiz
Deckgläschen	Carl Roth, Deutschland

2.6 Geräte

Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Hergestellt/vertrieben von
2100 Bioanalyser Instrument	Agilent Technologies, Inc., USA
Brutschrank	Binder, Deutschland
Gefrier- und Kühlschränke (-20 °C – 4 °C)	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Snijders Produktie B.V., Niederlande
Kryostat Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific, USA
Mikroskope	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	
Inverses Mikroskop Axio Vert A1	
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM710	
Nukleinsäureaufreinigungsautomat QIAcube	QIAGEN, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Eppendorf, Deutschland

Bezeichnung	Hergestellt/vertrieben von
qPCR-Cycler Bio-Rad cycler	Bio-Rad, USA
Schüttelinkubator GFL 3031	LAUDA Technology Ltd, Vereinigtes Königreich
Spektrophotometer NanoDrop 1000	PaqLab, Deutschland
Sterilwerkbank für molekularbiologische Arbeiten	ibs tecnomara GmbH, Deutschland
Sterilwerkbank für Zellkultur	Kojair Tech Oy, Finnland
Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG, Deutschland
Zellzählgerät NucleoCounter®	ChemoMetec, Dänemark

2.7 Software

Tabelle 9: Liste der verwendeten Software und netzbasierter bioinformatischer Dienste. Die Chatbots wurden ausschließlich als Inspiration für Formulierungshilfen und Synonyme verwendet, keine der Autorin zuvor unbekanntes Aussagen ungeprüft verwendet und nie ein gesamter Satz des Suchergebnisses deckungsgleich in die Arbeit übernommen.

Bezeichnung	Entwickelt/vertrieben von
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad, USA
ChatGPT	OpenAI, USA
Gemini (ehemals Bard)	Google LLC, USA
Inkscape 1.2	Inkscape-Team
Microsoft Office 365	Microsoft, USA
OmicsBox (Version 2.1.14)	BioBam, Spanien
Prism (Version 5 und 10)	GraphPad, USA
R Studio	Posit Software, USA
ZEN (<i>black edition</i>)	Zeiss, Deutschland
ZEN lite (<i>blue edition</i>)	Zeiss, Deutschland
Zotero 5.0	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, USA

2.8 Humane Gewebeproben

Das Gewebe stammte aus Parotidektomien gutartigen Gewebes bei Erkrankungen von Männern im Alter zwischen 16 und 83 Jahren. Die Patienten wurden darüber aufgeklärt, wie mit dem Gewebe verfahren wird, und haben eingewilligt das Gewebe zur Verfügung zu stellen. Die Studie wurde genehmigt durch die Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Antragsnummer 2020-15196). Die Parotidektomien erfolgten in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenkunde der Universitätsmedizin Mainz. Die Gewebeproben wurden in Ringerlösung auf Eis über Nacht ins Labor nach Lübeck geschickt.

2.9 Isolation der humanen Parotis-abgeleiteten Stammzellen

Folgende Gewebeproben aus humanen Parotiden wurden verwendet, um humane Parotis-abgeleitete Stammzellen (hPDSCs) zu isolieren (Tabelle 10).

Tabelle 10: Informationen zu den humanen Gewebeproben aus Parotiden und ihrer Verwendung.

Alter	Geschlecht	Generierte Zelllinie	Gewebeschnitte
80 Jahre	männlich	hPDSC1	X
83 Jahre	männlich	hPDSC2	
16 Jahre	männlich	hPDSC3	
50 Jahre	männlich	hPDSC4	

Die Isolation der hPDSCs erfolgte nach dem etablierten Protokoll zur Isolation von glandulären Stammzellen von Kruse et al. (Kruse et al., 2004). Dazu wurde die Parotisprobe zunächst mechanisch zerkleinert und dann mittels Kollagenaseverdau weiter dissoziiert (Abbildung 4, A-C). Diese Suspension wurde durch Trituration in Glaspipetten und Filtration durch ein Gazenet (200 µm Maschengröße) verfeinert. Nach 1-2 Waschschritten in Stammzellmedium mit 20 % FKS

(Zentrifugation für 5 min bei max. 130 g) bestand das Pellet aus Einzelzellen und Azini (Abbildung 4, D). Diese wurden in Stammzellmedium mit 20 % FKS (siehe Tabelle 11) resuspendiert und auf eine Fläche entsprechend der Pelletgröße ausgesät. Ab der dritten Passage wurde bei gutem Wachstumsverhalten statt eines Mediumwechsels eine Medienumstellung auf DMEM mit 10 % FKS durchgeführt.

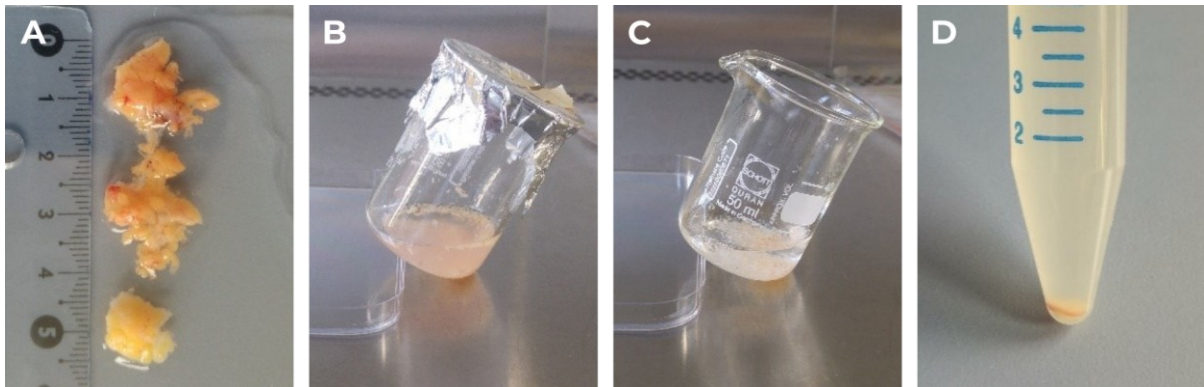


Abbildung 4: Isolation der hPDSCs. A. Gewebeprobe humaner Parotis; relativ groß, verfettet, ein wenig blutig. B. Dissoziiertes Gewebe in Digestionsmedium nach der ersten Digestionsinkubation; oben am Rand schwimmt fetthaltiger Gewebeanteil. C. Dissoziiertes Gewebe in Digestionsmedium nach zweiter Digestionsinkubation D. Gefilterte und zentrifugierte Suspension; Pellet beinhaltet Zellen und Azini, die in Stammzellmedium resuspendiert und ausgesät werden. Lineal gilt nur als Maßstab für A.

Tabelle 11: Medien zur Stammzellisolation.

Isolationsmedium	
10 mM	HEPES Puffer
70 % (v/v)	Modified Eagle's Medium
0.5 % (v/v)	Trasylol
1 % (w/v)	Bovines Serumalbumin
2,4 mM	Calciumchlorid
Digestionsmedium	
10 mM	HEPES Puffer
70 % (v/v)	Modified Eagle's Medium
0.5 % (v/v)	Trasylol
1 % (w/v)	Bovines Serumalbumin
2,4 mM	Calciumchlorid
0.63 PZ/mg	Kollagenase
Stammzellmedium bei Isolation	
Basalmedium	DMEM
20 % (v/v)	FKS
10 mg/ml	Penicillin/Streptomycin

2.10 Zellkultur

Die hPDSCs wurden über mehrere Passagen kultiviert, vermehrt und dann in unterschiedlichen Experimenten eingesetzt.

STANDARDKULTUR DER hPDSCs

Die hPDSCs wurden standardmäßig in adhärenter Kultur mit DMEM, 10 % FKS kultiviert. Alle 2-4 Tage wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst, bei 300 g abzentrifugiert, in DMEM, 10 % FKS resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 neu ausgesät.

Tabelle 12: Medien in der Stammzellkultur.

Stammzellmedium in Standardkultur	
Basalmedium	DMEM
10 % (v/v)	FKS
100 µg/ml	Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium (Standard, mit Serum)	
90 % (v/v)	FKS
10 % (v/v)	DMSO

DIFFERENZIERUNG DER hPDSCs DURCH MEDIEN FÜR EPITHELIALE ZELLKULTUR

Um die hPDSCs in epitheliale Speicheldrüsenzellen zu differenzieren, wurden die Stammzellen in den beiden bereits bekannten epithelialen Medien DMEM/F12-EGF und KSFM kultiviert (Tabelle 13). Dazu wurden die hPDSCs mit Trypsin-EDTA abgelöst, in drei Teile geteilt und abzentrifugiert. Jedes der drei Pellets wurde in einem anderen Kulturmedium resuspendiert und ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte wie bei der Standardkultur alle 2-4 Tage.

Tabelle 13: Epitheliale Differenzierungsmedien. DMEM/F12-EGF: von Gao et al. adaptiertes Medium zur epithelialen Differenzierung. KSFM: serumfreies Keratinozytenmedium.

DMEM/F12-EGF	
Basalmedium	DMEM/F12 (1:1)
5 % (v/v)	FKS
0,4 µg/ml	Hydrocortison
1,34 µg/ml	Triiodothyronin
2 mM	L-Glutamin
10 µg/ml	ITS
10 ng/ml	rhEGF
100 µg/ml	Penicillin/Streptomycin
KSFM (supplementiert)	
Basalmedium	KSFM
50 µg/ml	BPE
5 ng/ml	rhEGF
100 µg/ml	Penicillin/Streptomycin

3D-KULTUR DER HPDSCS

Die 3D-Kultur der hPDSCs erfolgte in Agarose-Mikromulden-Platten (AMP), die eine einfache und ertragreiche Kultivierung von Sphäroiden ermöglichen. Die AMP wurden eigens nach dem Protokoll von Panzer hergestellt (vgl. Abbildung 5). Dazu wurde die gewünschte Form zunächst im 3D-Drucker vorgefertigt (Abbildung 5, erstes Bild), dann ein Negativ aus Silikon gegossen (Abbildung 5, zweites Bild) und schließlich je 1,8 ml Agarosegel (2 % in PBS) in die sterilen Silikonformen gegeben. Die entstehenden AMP weisen 913 konische Vertiefungen mit einem Öffnungsdurchmesser von 750 µm auf. Nach dem Auskühlen des Agarosegels wurden die AMP mithilfe einer sterilen Pinzette herausgelöst. Die Lagerung erfolgte maximal 1 Woche in PBS bei 4 °C. Vor der Besiedelung mit Zellen wurden die AMP im entsprechenden Kulturmedium mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert (vgl. Abbildung 5, drittes Bild).

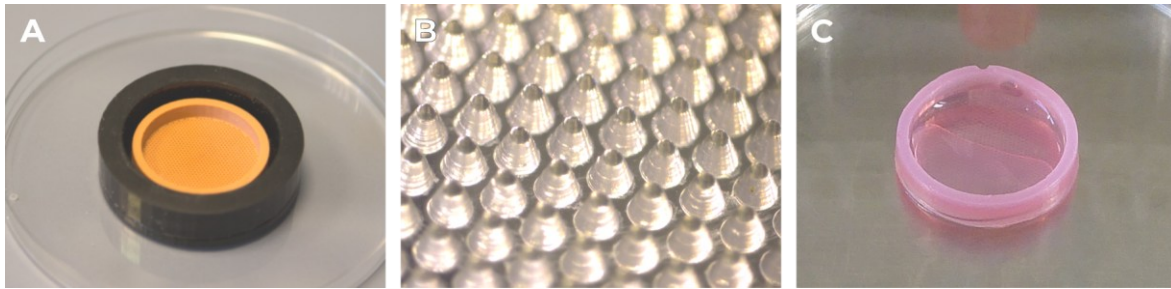


Abbildung 5: Herstellungsschritte der AMP. A 3D-gedruckte Form der AMP, welche als Form für das Negativ aus Silikon fungiert (B). B Silikon-Negativ; 913 kegelförmige Noppen mit einem Durchmesser von 700 μm an der breitesten Stelle und einer Höhe von 750 μm . C AMP aus 1,8 ml Agarosegel (2 % in PBS); bereits im Kulturmedium inkubiert. Fotos: 1, 2 von (Panzer, 2023); 3 selbst angefertigt. Details zur Herstellung: (Panzer, 2023).

Kultur- und Differenzierungsmedien in der 3D-Zellkultur

In vorherigen Versuchen wurden sowohl das Standardmedium für die Kultur der hPDSCs als auch die epithelialen Differenzierungsmedien DMEM/F12-EGF und KSFM als mögliche Kulturmedien für die 3D-Kultur identifiziert. In Studien zur 3D-Kultur von Speicheldrüsenzellen wurden Keratinozytenmedien, DMEM/F12-basierte Medien und andere serumfreie Medien bereits erfolgreich eingesetzt (Joraku et al., 2007; Pradhan-Bhatt et al., 2013; Song et al., 2021; Sui et al., 2020).

Die AMP wurden in 6-well-Platten gelegt und zur Äquilibration mindestens je 1 ml Medium in und um die AMP gegeben. Die Anzahl der eingesetzten Zellen und die Dauer der Kultur orientierte sich an dem Protokoll zur Herstellung multizellulärer Testsysteme (Kruse & Fuhr, 2007). Es wurden 400 Zellen pro Mulde in der AMP, also pro Sphäroid, eingesetzt. Dementsprechend wurden pro AMP 365200 Zellen in 1 ml des jeweiligen Kulturmediums suspendiert, das Medium im Inneren der AMP abgesaugt und die Zellsuspension auf der Oberfläche der AMP verteilt. Außerdem wurde 1 ml zellfreies Medium in das *well* um die AMP gegeben. So wurden die Zellen für einen Tag kultiviert, während dem sie an den Grund der Mulden sinken konnten. Am ersten Tag wurde das Medium gewechselt; danach erfolgte der Medienwechsel alle 2-4 Tage. Am 7. Tag wurden die Sphäroide geerntet und für folgende Analysen verwendet.

Ernte der Sphäroide aus hPDSCs

Die AMP wurden zur Ernte in eine Petrischale überführt und etwa ein Fünftel des Rands abgebrochen (siehe Abbildung 6, B). Um die Sphäroide aus den Mulden zu lösen, wurden diese mit

PBS aus einer senkrecht aufgesetzten Pipette herausgespült. Je nach anschließender Analyse wurden die Sphäroide aus der Suspension in andere Gefäße überführt (siehe entsprechende Abschnitte vor analytischer Methode). Eine Ausnahme bildete die Ernte der Sphäroide für die quantitative Analyse der Vitalität. Hierfür wurden die Sphäroide direkt in den AMP gefärbt (siehe Lebend-Tot-Färbungen der Sphäroide).

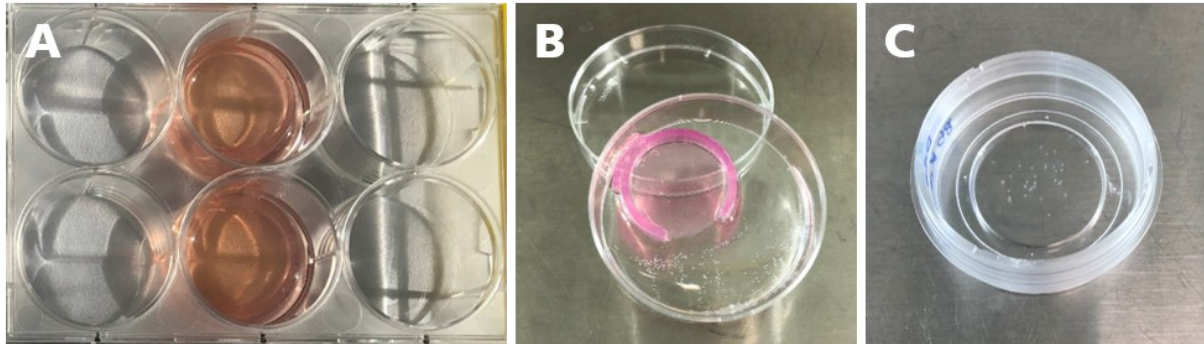


Abbildung 6: 3D-Kultur der hPDSCs. A Zwei AMP in einer 6-well-Platte. B Ernte der Sphäroide: Rand der AMP aufgebrochen, Sphäroide mit PBS aus Mulden gespült. C Anheften der Sphäroide in Cell-Tak™-beschichteter ibidi-Schale.

2.11 Lebend-Tot-Färbungen der Sphäroide

Die Sphäroide wurden auf die Vitalität der Zellen untersucht, indem sie mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) gefärbt wurden. PI färbt die Zellkerne toter Zellen, während FDA das Zytosol metabolisch aktiver Zellen färbt. Zur Lokalisierung der Zellkerne wurden diese außerdem mit Hoechst 33342 eingefärbt. Die Zusammensetzung der Färbelösung sowie die Optima der Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 14 zu finden. Die Färbelösung wurde nach den Angaben in Tabelle 14 angesetzt und bis zum Einsatz vor Licht geschützt maximal 2 h bei 4 °C gelagert. Der Färbeprozess ist in den folgenden Abschnitten beschrieben und wurde angepasst, je nachdem, ob eine quantitative oder eine detailorientierte Analyse stattfinden sollte.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Färbelösung zur Vitalitätsanalyse samt Optima der Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe.

Färbelösung		Absorptions- wellenlänge	Emissions- wellenlänge
Basis	PBS		
0,02 mg/ml	Hoechst 33342	405 nm	451 nm
0,008 mg/ml	FDA	488 nm	540 nm
0,02 mg/ml	PI	550 nm	652 nm

QUANTITATIVE ANALYSE DER VITALITÄT

Zur quantitativen Analyse der Vitalität der Sphäroide wurden Übersichtsaufnahmen von gesamten AMP erstellt. Dazu wurden die Sphäroide innerhalb der AMP gefärbt. Zuvor wurde das Medium abgenommen und die Sphäroide für 5 min mit PBS inkubiert, um Serumbestandteile herauszuwaschen. Nach dem Waschschrift wurden 500 μ L der Färbelösung vorsichtig auf einem AMP verteilt. Die Sphäroide wurden 20 min abgedunkelt bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann erneut mit PBS gewaschen. Schließlich wurde die Färbung mittels einer Übersichtsaufnahme des gesamten AMP am Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 dokumentiert. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) überprüft. Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander erfolgte *post hoc* mit dem Dunn-Test. Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

DETAILAUFNAHMEN DER LEBEND-TOT-FÄRBUNGEN

Um erkennen zu können, ob die Sphäroide an bestimmten Stellen vermehrt tote Zellen aufweisen, wurden Detailaufnahmen der Lebend-Tot-Färbungen mithilfe eines konfokalen Laserscanning Mikroskops angefertigt. Für Detailaufnahmen der Sphäroide wurden diese vor der Färbung in μ -Dish 35 mm-Zellkulturschalen (ibidi-Zellkulturschalen) überführt. Diese Zellkulturschalen zeichnen sich durch ihren dünnen Boden aus #1.5 ibidi Polymer mit einer Stärke von 180 μ m (+10/-5 μ m) aus. Dieser ermöglicht sowohl die Adhäsion gewöhnlicher Zellkulturen als auch das Färben und Mikroskopieren der Zellen oder Sphäroide in derselben Schale.

Beschichtung der ibidi-Zellkulturschalen

Da die Sphäroide nicht in den ibidi-Zellkulturschalen heranwachsen, mussten sie mithilfe des Zell- und Gewebeklebers Cell-Tak™ für präzise Aufnahmen am Boden angeheftet werden. Dazu wurden 400 µL einer Lösung mit Cell-Tak™ (siehe Tabelle 15) auf die Wachstumsfläche einer ibidi-Zellkulturschale gegeben und für mindestens 25 min wirken lassen. Danach wurde die beschichtete Fläche zweimal mit sterilem vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gewaschen. Entweder wurden diese beschichteten ibidi-Zellkulturschalen trocknen gelassen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert oder direkt verwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Cell-Tak™-Lösung zur Beschichtung der ibidi-Zellkulturschalen.

Cell-Tak™-Lösung	
Basis	Steriles VE-Wasser
18,2 mmol/L	Natriumhydroxid
100 mmol/L	Natriumbicarbonat
0,05256 g/L	Cell-Tak™

Färbung

Die Sphäroide wurden wie oben beschrieben aus den Mulden gelöst (siehe S. 45). Aus der Suspension wurden sie in wenig PBS auf die beschichteten ibidi-Zellkulturschalen überführt. Das PBS wurde abgenommen, sodass die Sphäroide leicht auf der Beschichtung antrocknen konnten (4-8 min). Dann wurde vorsichtig mit PBS gewaschen, sodass möglichst wenige Sphäroide abschwimmen. So konnten sie bis zur Färbung für kurze Zeit gelagert werden. Die Sphäroide wurden 20 min abgedunkelt bei RT inkubiert und dann erneut mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die gefärbten Sphäroide am Laserscanning-Mikroskop LSM710 betrachtet und dreidimensionale Aufnahmen anfertigt.

2.12 Genexpressionsanalysen

Die Genexpression der Zellen in unterschiedlichen Kulturen wurde auf Transkriptebene auf zwei verschiedene Arten analysiert: Die Expression ausgewählter Marker wurde durch Einsatz entsprechender Primer in qRT-PCR-Ansätzen untersucht. Die differenzielle Expression weiterer Marker und ganzer *Gen-Cluster* wurde durch Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren (RNA-Seq) analysiert.

ERNTE UND LYSE DER ZELLKULTUREN

Adhärenente Zellkulturen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst, mit dem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert und bei 180 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -80 °C bis zur RNA-Extraktion gelagert.

Sphäroide wurden bereits vor dem Einfrieren lysiert, um eventuell enthaltene RNasen mit Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) zu inhibieren und so die RNA zu schützen. Dazu wurden die Zellen mithilfe einer Spritze und einer Kanüle in 600 µL Lysepuffer RA1 mit 1 % (v/v) des Reduktionsmittels TCEP lysiert. Die Zellpellets aus adhärenenten Zellkulturen wurden nach dem Auftauen auf Eis ebenso lysiert.

RNA-EXTRAKTION

Zur Extraktion der RNA aus Zellen und Sphäroiden wurde das Kit NucleoSpin Mini verwendet. Die Aufreinigung der RNA im NucleoSpin-Mini-Kit basiert auf Bindung an Säulen und enthält zusätzlich einen Schritt zum DNA-Verdau. Die Extraktion wurde entweder von Hand oder automatisiert im QIAcube durchgeführt. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration mittels Spektrophotometer NanoDrop 1000 bestimmt. Die Proben, die zur RIN-Wert-Messung und für RNA-Seq verwendet werden sollten, wurden aliquotiert, um Einfrier-Auftau-Zyklen zu vermeiden. Alle Proben wurden bei -80 °C gelagert.

qRT-PCR

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden zwei Kits (Tabelle 2) und die passenden Primer (Tabelle 16) von QIAGEN verwendet. Zunächst wurde mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription-Kit nach dem Protokoll des Herstellers die RNA zu cDNA transkribiert. Dazu wurde zuerst in Abwesenheit der reversen Transkriptase ein gDNA-Verdau mit der RNA-Probe vorgenommen. Nach der Zugabe der reversen Transkriptase sowie einem Primermix und Puffer samt Nukleotiden wurde der Ansatz zur reversen Transkription für 30 min bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurde die reverse Transkriptase 3 min bei 95 °C inaktiviert und die cDNA auf 4 °C heruntergekühlt. Schließlich wurde die cDNA-Konzentration der Proben mithilfe von RNase-freiem Wasser angeglichen. Wenn die qPCR nicht am selben Tag erfolgte, wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

Die cDNA wurde dann in einer semiquantitativen PCR (qPCR) mit den Bestandteilen des QuantiFast SYBR Green PCR Kits und QuantiTect Primern für ausgewählte Marker gemäß dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Jede cDNA-Probe wurde dreifach analysiert (technisches Triplikat). Zu Beginn der PCR wurde die HotStarTaq Plus DNA Polymerase 5 min bei 95 °C aktiviert. Nach einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 s, erfolgten Primerhybridisierung und Elongation gemeinsam bei 60 °C für 30 s. Denaturierung sowie Hybridisierung und Elongation wurden in 40 Zyklen wiederholt. Danach wurde die Platte erneut 15 s auf 95 °C erhitzt, bevor eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellt wurde. Zur Erstellung der Schmelzkurve wurde die Platte um 0,5 °C pro 15 s von 60 °C auf 95 °C erhitzt. Schließlich wurde das PCR-Produkt auf 4 °C heruntergekühlt.

Um die Ergebnisse der PCR-Läufe vergleichbar zu machen, wurde der Baseline-Schwellenwert der relativen Fluoreszenz-Einheit (relative fluorescence unit = RFU) in allen Analysen auf 300 RFU angeglichen. Wenn die Schmelztemperatur der PCR-Produkte im Triplikat einer Probe mehr als 0,5 °C voneinander abwich, wurde diese Probe nicht in die Auswertung einbezogen. Ebenso von der Analyse ausgeschlossen wurden Proben mit einem Schwellenwertzyklus (C_t) über 35 Zyklen. Die Genexpression wurde relativ zum Haushaltsgen Ribosomales Protein S18 (RPS18) mittels einer Variation der $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode angegeben (Livak & Schmittgen, 2001). Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe einer einfaktoriellem Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) überprüft. Der Vergleich

der einzelnen Gruppen untereinander erfolgte *post hoc* mit dem Dunn-Test. Die Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

Tabelle 16: Liste der mittels qRT-PCR untersuchten Marker und ihrer Bedeutung.

Gen	Bedeutung
AMY1A	α -Amylase 1; Speichelenzym, das Stärke spaltet
AQP5	Wasserkanal Aquaporin 5; in Azini, durch welchen Wasser zur Speichelproduktion ins Lumen strömt
CASP3	Apoptosemarker Caspase 3
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Conductance Regulator</i> , Chloridkanal, der zur Chloridresorption in Gangzellen beiträgt
CHRM3	Cholinerger Rezeptor M(uskarinerg) 3, durch dessen Stimulierung Signalkaskaden zur Speichelproduktion ausgelöst werden
MKI67	Proliferationsmarker Ki67
NES	Charakteristischer Stammzellmarker der hPDSCs
ANO1	Anoctamin 1, Chloridionenkanal in azinären Zellen, auch TMEM16A

2.13 Immunhistochemische Analysen

Um die Genexpressionsdaten validieren und die Translation der untersuchten Marker analysieren zu können, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt.

KRYOFIXIERUNG UND SCHNITTE DER GEWEBEPROBEN

Als Kontrollfärbung der speicheldrüsen-spezifischen Marker wurden Parotisschnitte gefärbt. Die Parotisprobe wurde über Nacht in Ringerlösung auf Eis geliefert. Am Tag nach der Entnahme wurde die Probe erneut mit Ringerlösung gespült und abgetropft. Ein etwa 3 x 3 x 5 mm großes Stück wurde separiert, in PFA (4 %) mit Sucrose (10 %) fixiert und in Tissue-Tek®-Einbettmedium zunächst bei -20 °C eingefroren und dann bei -80 °C gelagert. In einem Kryostaten wurden Schnitte mit einer Dicke von 12 μ m angefertigt, die wiederum bis zur Färbung bei -20 °C gelagert wurden.

ERNTE UND FIXIERUNG DER ZELLKULTUREN

Zur Färbung von adhärennten Zellkulturen wurden Zellen in ibidi-Zellkulturschalen ausgesät und bis etwa 80 % Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen in Paraformaldehyd (PFA) mit Sucrose 10 min bei RT fixiert, zweimal 5 min in PBS gewaschen und bis zur Färbung bei 4 °C in PBS gelagert. Die Sphäroide wurden wie oben beschrieben aus den Mulden gelöst (siehe Abbildung 6, B). Aus der Suspension wurden sie in wenig PBS auf die mit Cell-TakTM beschichteten ibidi-Zellkulturschalen überführt (Protokoll für Beschichtung siehe Abbildung 6, C).

Tabelle 17: Lösungen zur Immunfluoreszenzfärbung.

Fixierlösung		2D & 3D
	Basis	PBS
	4 % (w/v)	PFA
	10 % (w/v)	Sucrose
		pH 7,4
Permeabilisierungslösung		2D
	Basis	PBS
	0,1 %	Triton TM X-100
Antikörperverdünnungslösung		2D
	150 mM	Natriumchlorid
	10 mM	Tris
	0,05 % (v/v)	Triton TM X-100
	0,1 % (w/v)	BSA
		pH 8
Basislösung 3D (PBSTT) = Permeabilisierungslösung		3D
	Basis	PBS
	0,1 % (v/v)	Triton TM X-100

 0,1 % (v/v) TWEEN® 20

Blockierungs- und Antikörperverdünnungslösung	3D
--	----

 Basis PBSTT

 2 % (w/v) BSA

FÄRBEPROTOKOLLE

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der zwei- und dreidimensionalen Proben wie Zelldichte und Schichttiefe wurden grundsätzlich zwei verschiedene Färbeprotokolle verwendet. Des Weiteren wurde ein zusätzliches Protokoll für den Antikörper für CHR3 auf zweidimensionalen Proben angewendet, das vom Hersteller empfohlen wurde.

Standardimmunfluoreszenzfärbung zweidimensionaler Proben

Die zweidimensional in ibidi-Zellkulturschalen kultivierten Zellen sowie Schnitte von kryofixiertem Gewebe wurden nach dem Protokoll in Tabelle 18 gefärbt. Die kryofixierten Schnitte wurden mindestens eine halbe Stunde bei RT getrocknet, bevor sie 10 min mit PFA mit Sucrose fixiert wurden. Damit die Proben nicht austrockneten, wurden die ibidi-Zellkulturschalen während längerer Inkubationszeiten verschlossen und die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet. Zudem wurden die Proben bei Bedarf in einer feuchten Kammer inkubiert. Wenn die Zellen zuvor bei 4 °C in PBS gelagert wurden, wurden sie vor dem Permeabilisieren erneut einmal mit PBS gewaschen. Die eingesetzten Konzentrationen der Antikörper und Isotypenkontrollen sind in Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6 zu finden.

Tabelle 18: Färbeprotokoll für zweidimensional kultivierte Zellen und kryofixierte Gewebeschnitte. Das Volumen bezieht sich auf die Färbungen in ibidi-Zellkulturschalen; für Schnitte wurde nur so viel eingesetzt, dass sie durchgängig benetzt waren. Eingesetzte Konzentrationen der Antikörper siehe Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6; Zusammensetzung der Reagenzien siehe Tabelle 17.

Schritt	Temp.	Dauer	Volumen	Reagenz
Fixierung	RT	10 min	500 μ L	PFA mit Sucrose
Waschen	RT	3 x 5 min	500 μ L	PBS
Lagerung	4 °C	max. 2 Monate	1500 μ L	PBS
Waschen	RT	1 x 5 min	500 μ L	PBS
Permeabilisierung	RT	10 min	500 μ L	0,1 % TritonX100 in PBS
Waschen	RT	3 x 5 min	500 μ L	PBS
Blockierung	RT	1 h	500 μ L	PBS + 10 % Ziegennormalserum
Primärantikörper	4 °C	ü. N.	400 μ L	TBST + 0,1% BSA
Waschen	RT	3 x 5 min	500 μ L	PBS
Sekundärantikörper	37 °C	1 h	400 μ L	TBST + 0,1% BSA
Waschen	RT	2 x 5 min	500 μ L	PBS
Kernfärbung	RT	5 min	400 μ L	1 μ g/ml DAPI in PBS
Waschen	RT	2 x 5 min	500 μ L	PBS
	RT	1 x	500 μ L	VE-Wasser
Eindecken	RT		1 Tropfen	Vectashield, Deckgläschen
Lagerung	4 °C			

Immunfluoreszenzfärbung zweidimensionaler Proben mit Antikörper für CHR3

Die Immunfluoreszenzfärbung mit CHR3-Antikörpern erzeugte nach dem Standardprotokoll keine distinkten, artefaktarmen Färbungen. Deshalb wurden die CHR3-Färbungen zweidimensionaler Proben nach dem Protokoll des Antikörperherstellers durchgeführt. Bis zur Permeabilisierung wurden die Proben ebenso behandelt wie die anderen zweidimensionalen Proben. Die Blockierung erfolgte jedoch mit anderem Serum: die Proben wurden für 75 min bei RT in 4 %

FKS in PBS blockiert. Auch um die Antikörper zu lösen, wurde die Blockierungslösung mit FKS verwendet. Der Primärantikörper wurde ebenfalls bei 4 °C über Nacht inkubiert. Dann wurde viermal 10 min mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper für 90 min bei RT im Dunkeln inkubiert wurde. Schließlich wurde mit DAPI eine Kernfärbung vorgenommen und die Proben gewaschen und eingedeckt wie die anderen zweidimensionalen Proben.

Immunfluoreszenzfärbung dreidimensionaler Proben

Die dreidimensionalen Sphäroide wurden nach einem Protokoll gefärbt, das an humanen Schweißdrüsen entwickelt wurde (Teresa Buck, 2022). Buck hat die Reagenzien sowie die Dauer der einzelnen Schritte angepasst und im Vergleich zu zweidimensionalen Proben auf 48-72 h verlängert. Außerdem wurden die gefärbten Sphäroide mit Glycerin (80 % *aq.*) behandelt. Dies nähert den Brechungsindex der Probe an den der Linse des Objektivs an. Dadurch kann das Licht des konfokalen *Laserscanning*-Mikroskops auch tiefere Schichten sowie das fluoreszierte Licht den Sensor besser erreichen. Somit können dreidimensionale Proben wie die Sphäroide im Ganzen mikroskopiert werden.

Tabelle 19: Färbeprotokoll für Sphäroide. Zusammensetzung der Reagenzien siehe Tabelle 17.

Schritt	Temp.	Dauer	Reagenz
Fixierung	4 °C	48-72 h	PFA mit Sucrose
Waschen	RT	3 x 5 min	PBS
Permeabilisierung	4 °C	48-72 h	PBSTT
Waschen	RT	3 x 5 min	PBSTT
Blockierung	4 °C	48-72 h	PBSTT + 2 % BSA
Primärantikörper	4 °C	48-72 h	PBSTT + 2 % BSA + Antikörper
Waschen	RT	3 x 5 min	
Sekundärantikörper samt Kernfärbung	4 °C	48-72 h	PBSTT + 2 % BSA + Antikörper +1 µg/ml DAPI
Waschen	RT	3 x 5 min	
<i>Clearing</i>	4 °C	48-72 h	80 % Glycerin mit VE-Wasser

Schritt	Temp.	Dauer	Reagenz
Eindecken	RT		Vectashield, Deckgläschen
Lagerung	4 °C		

MIKROSKOPIE

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen wurden vorrangig mit dem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop LSM710 unter Benutzung der Software ZEN (*black edition*) angefertigt. Die zweidimensionalen Proben wurden teilweise auch am Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 mikroskopiert (Software ZEN, *blue edition*). Die Aufnahmen wurden mittels der ZEN-Softwares und Image J verarbeitet.

2.14 RNA-Seq

Zur weiterführenden Analyse der Unterschiede in der Genexpression wurde RNA der hPDSCs aus drei Kulturkonditionen bei Biosearch™ Technologies sequenziert: hPDSCs aus adhärenenten Kulturen in DMEM10 und DMEM/F12-EGF sowie hPDSC-Sphäroide kultiviert in DMEM/F12-EGF.

VORBEREITUNG DER RNA-PROBEN

Um zu bestimmen, ob die RNA-Proben für RNA-Seq geeignet sind, wurde zunächst der RIN-Wert mit einem 2100 Bioanalyzer ermittelt. Nur RNA mit einem RIN-Wert ≥ 8 wurde verwendet und in Aliquots à 2 μg (gelöst in RNase-freiem Wasser, auf Trockeneis) eingeschickt.

RNA-SEQ BEI BIOSEARCH™ TECHNOLOGIES

Die folgenden Schritte wurden bei Biosearch™ Technologies durchgeführt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Prozessschritte der RNA-Sequenzierung samt Vorbereitung.

Prozessschritt	Kit/System	Firma
Qualitätskontrolle RNA	Fragmentanalyser	Agilent Technologies, USA
mRNA-Isolation	NEBNext Poly(A) Magnetic Isolation Modules	New England Biolabs, USA
cDNA-Synthese	NEBNext RNA First Strand Synthesis Module, NEBNext RNA Second Strand Synthesis Module	New England Biolabs, USA
cDNA-Aufreinigung	AMPure XP	Beckman Coulter, USA
Anlegen der cDNA-Bibliotheken	Encore Rapid DR Multiplex System 1-96	NuGEN, USA
Amplifikation der cDNA-Bibliotheken	MyTaq-Polymerase Standardprimer	Bioline, USA Illumina, USA
Qualitätskontrolle cDNA-Bibliotheken	Fragmentanalyser Qubit	Agilent Technologies, USA Thermo Fisher Scientific, USA
Sequenzierung	NextSeq550/500-System	Illumina, USA
<i>Base Calling</i>	Real-Time Analysis-Software (RTA2)	Illumina, USA
<i>Demultiplexing, Clipping, FastQC v0.11.9-Bericht</i>	bcl2fastq v2.20-Software	Illumina, USA

Vor der Sequenzierung wurden die cDNA-Bibliotheken in 100 µL mit MyTaq-Polymerase und Standardprimern für 12 Zyklen amplifiziert. Fragmente der Größe 300 – 500 bp wurden mittels Gelelektrophorese selektiert und vor der Amplifikation erneut auf ihre Qualität geprüft. Daraus wurden cDNA-Bibliotheken angelegt.

Zur Amplifizierung des Signals mussten zunächst cDNA-Fragment-Kopie-Verbände gebildet werden (*Cluster Generation*), was über Brücken-Amplifikation erfolgte. Dieser Prozess wurde mehrfach wiederholt, sodass sich um die Position des als erstes gebundenen Original-cDNA-Fragment-Komplexes ein Verbund an Kopien und komplementären Kopien auf der Durchflusszelle

bildete. Die cDNA-Bibliotheken wurden dann im Illumina NextSeq550/500-System sequenziert. Dabei wurde jeder Base ein Qualitätsscore zugewiesen, welche gemeinsam mit den Basendaten einer *Lane* in *Base-Call*-Dateien (.bcl) gespeichert wurden. Die Sequenzierung in dieser Arbeit erfolgte mit gepaarten Enden (engl. *paired-end*). Bei Sequenzierungen mit gepaarten Enden entstehen zwei *reads* pro *Cluster*. Es wurden 5 Mio *reads* pro Probe sequenziert, indem die cDNA-Fragmente in jeweils 150 Zyklen von beiden Enden sequenziert wurden.

Biosearch™ Technologies stellte die Rohdaten und Adapterrest-bereinigten FASTQ-Dateien sowie die zugehörigen FastQC v0.11.9-Berichte, Informationen zum Ablauf der Probenaufbereitung und Sequenzierung und eine Tabelle mit den Gesamtzahlen der *reads* pro Probe (roh und Adapterrest-bereinigt) zur weiteren Analyse zur Verfügung.

DATENAUFBEREITUNG

Die Datenaufbereitung der RNA-Seq-Ergebnisse wurde mithilfe der Software OmicsBox durchgeführt, die gängige Algorithmen und Skripte zur NGS-Analyse hinter einer grafischen Benutzeroberfläche vereint (Tabelle 21).

Tabelle 21: Details zur Datenaufbereitung der RNA-Seq-Ergebnisse in OmicsBox. *Alignment*, Quantifizierung der *reads* (*counts*) und die differenzielle Genexpressionsanalyse (DEA) wurden mithilfe von Tools in OmicsBox durchgeführt. CPM = *counts per million*; logFC = $\log(\text{fold change})$, zu Deutsch: Logarithmus des Vielfachen der Änderung; FDR = *false discovery rate*, zu Deutsch: Falscherkennungsrate; DEG = differenziell exprimierte Gene; GLM = *generalized linear model*; HKA = Hauptkomponentenanalyse; TMM = *weighted trimmed mean of M-values*. Parameter-Einstellungen: alles, das nicht explizit erwähnt wird, wurde in den Standardeinstellungen belassen. Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit wurden die Einstellungen wortwörtlich aufgeführt und nicht übersetzt. *für Details zum experimentellen Design und der Festlegung der Faktoren im *Paired Design* siehe Tabelle A. 1 und S. 60.

Schritt	<i>Alignment</i>	<i>Counts</i>	DEA
Tool	STAR	HTseq	edgeR
Art des <i>Tools</i>	C++ code	Python-Modul	R-Paket

Schritt		<i>Alignment</i>	<i>Counts</i>	DEA
Input	Referenz	GCF_000001405.4_0_GRCh38.p14_genomic.gff (Download: NCBI, 25.5.2022)	GCF_000001405.4_0_GRCh38.p14_genomic.gff (Download: NCBI, 25.5.2022)	-
	Proben	rohe <i>reads</i>	nicht normalisierte, <i>alignte reads</i>	<i>Count</i> -Tabelle
Parameter-Einstellungen		<i>paired end, quantification level: gene, grouped by name, overhang: 100, sequencing platform: Illumina</i>	<i>gene quantification level, group by name, non-strand specific, union overlap mode, lowest mapping quality = 10</i>	<i>CPM-filter = 2 samples ≥ 2 CPM, normalization: TMM, paired design*, GLM (Quasi Likelihood F-Test), robust, Benjamini-Hochberg</i>
Output	Daten	.bam mit <i>alignten reads</i> , Metadaten	<i>Count</i> -Tabelle, Metadaten	u. a. logFC, FDR → DEG, Metadaten
	Graphen	Balkendiagramm Metadaten	HKA	<i>Volcano-Plot, Heatmap</i>
Literatur		Dobin et al., 2013	Anders et al., 2015	Robinson et al., 2010

Alignment und *Counts* – Zuweisung und Quantifizierung der *reads*

Zunächst wurden die *reads* mithilfe von „*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*“ (STAR) anhand eines Referenzgenoms abgeglichen und ihnen Positionen auf dem Genom zugewiesen (*Alignment*). STAR erfolgt in zwei Schritten: der Suche nach exakten Übereinstimmungen kleiner Sequenzen zwischen *reads* und Referenzgenom (*seed search*) und dem Zusammenfügen und Ergänzen dieser einzelnen Übereinstimmungen (Dobin et al., 2013).

Nachdem die *reads* bestimmten Positionen auf dem Genom zugewiesen waren, wurde die Anzahl der *reads* bestimmt, die einem bestimmten Abschnitt (z. B. Gen, Exon etc.) zugeordnet wurde (*count*). Dies erfolgte mithilfe von HTSeq, einem Modul mit Python-Skripten zur Analyse von NGS-Daten (Anders et al., 2015). Neben den Dateien mit den zugewiesenen *reads* wurde zur

Quantifizierung ein annotiertes Referenzgenom benötigt. Durch die Annotationen, also die Einteilung des Referenzgenoms zu funktionalen Abschnitten wie Genen, können *reads* bezüglich der erwünschten Einteilung quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden die *counts* anhand von Genen erstellt und in der Liste nach Namen sortiert. In dem Fall, dass ein *read* an zwei sich überschneidenden Genen *mappte* (von engl. *mapping*, hier zu Deutsch: *mappen* = übereinstimmen bei Abgleich), wurde dieser *read* als zweideutig (*ambiguous*) gewertet (*overlap resolution mode in HTSeq: union*). Nur die eindeutig an einem Gen (*Feature*) *alignen reads* wurden gezählt und somit als *counts* in die Bibliothek aufgenommen.

Auf Grundlage der *counts* wurde anschließend eine Hauptkomponentenanalyse (HKA) mit drei Hauptkomponenten durchgeführt, um einen ersten Eindruck über die (Un-)Ähnlichkeit der Proben zu erhalten.

Differenzielle Genexpressionsanalyse (DEA)

Der nächste Schritt der Auswertung der RNA-Seq-Daten war, zu untersuchen, ob sich die Genexpression in den hPDSCs je nach Kulturkondition signifikant unterschied. Zur Analyse der differenziellen Genexpression wurde das Bioconductor-Paket edgeR („*empirical analysis of Differential Gene Expression* (DGE) in R“) verwendet (Robinson et al., 2010). Dazu wurden die nicht normalisierten *counts* eingesetzt, die bei der Quantifizierung in HT-Seq eindeutig bestimmten Genen zugewiesen werden konnten. Bevor die Expressionsdaten mittels statistischer Tests miteinander verglichen wurden, wurden gering exprimierte Gene von der Analyse ausgeschlossen. Nur die Gene, die in mindestens zwei Proben eine Expression von mindestens 2 *counts per million* (CPM) aufwiesen, wurden in die DEA eingeschlossen. Des Weiteren wurden Skalierungsfaktoren berechnet, die die unterschiedlichen Größen der Bibliotheken im statistischen Modell normalisieren. Dazu wurden gewichtete getrimmte Mittelwerte von M-Werten herangezogen (engl. *weighted trimmed mean of M-values* = TMM, (Robinson & Oshlack, 2010)).

Der Fokus der differenziellen Genexpressionsanalyse (DEA) lag darauf, herauszufinden, was die hPDSCs in dreidimensionaler Kultur von denen in adhärenter Kultur unterscheidet und ob bereits das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF einen signifikanten Einfluss auf die Zellen hat. Deswegen wurden die folgenden Konditionen paarweise verglichen:

1. Welchen Einfluss hat das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF auf die hPDSCs?
2D-DMEM10 vs. 2D-DMEM/F12-EGF, Medienvergleich
2. Welchen Einfluss hat die dreidimensionale Kultur auf die hPDSCs?
2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-EGF, 2D-3D-Vergleich

Der Vergleich erfolgte über einen Logarithmus des Vielfachen der Änderung ($\log_2\text{fold-changes} = \log_2$ von vielfacher Änderung = $\log_2\left(\frac{\text{counts (Gen 1 in Kondition 1)}}{\text{counts (Gen 1 in Kondition 2)}}\right) = \log\text{FC}$) und wurde mithilfe des *Quasi-likelihood F-Tests* und der Benjamini-Hochberg-Methode statistisch getestet (engl. *false discovery rate* = FDR, zu Deutsch: Falscherkennungsrate). Als höher exprimiert gilt ein Gen, wenn $\text{FDR} \leq 0.05$ und $\log\text{FC} > 1$ sind; als niedriger exprimiert, wenn $\text{FDR} \leq 0.05$ und $\log\text{FC} < -1$ sind. Als primärer experimenteller Faktor im experimentellen Design wurde die Zellkulturkondition gesetzt, als sekundärer Faktor die Zelllinie (für Übersicht siehe Tabelle A. 1). Als Referenzkondition wurde in beiden Vergleichen die zuerst genannte festgelegt:

→ 2D-DMEM10 im Medienvergleich 2D-DMEM10 vs. 2D-DMEM/F12-EGF,

→ 2D-DMEM/F12-EGF im 2D-3D-Vergleich 2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-EGF.

Das heißt für die Bedeutung der Ergebnisse z. B. wenn Gen X im Medienvergleich Daten mit $\text{FDR} \leq 0.05$ und $\log\text{FC} > 1$ zugeordnet wurden, wird Gen X in 2D-DMEM/F12-EGF höher exprimiert als in Standardkultur.

Die differenziell exprimierten Gene (DEG) wurden jeweils in *Volcano-Plots* dargestellt. Dazu wird in einem Streudiagramm der Logarithmus des Vielfachen der Änderung der DEG ($\log\text{FC}$) auf der x-Achse gegenüber dem negativen Logarithmus der FDR ($-\log_{10}(\text{FDR})$) auf der y-Achse aufgetragen.

Außerdem wurden die DEG nach minimaler FDR an erster Stelle sortiert. Die Top 25 der differenziell exprimierten Gene der beiden DEA wurden in einer *Heatmap* gemeinsam visualisiert. In der *Heatmap* wurden die DEG und Proben hierarchisch *geclustert*. Die hierarchische *Cluster-Analyse* beruht auf dem euklidischen Abstand zwischen den Genen (vertikales *Clustering*) und Proben (horizontales *Clustering*) in Form ihrer skalierten Expressionsdaten (*z-scores*). *Z-scores* sind wie folgt auf die Probe skaliert:

$$z\text{-score} = \frac{\text{Genexpression einer Probe [counts]} - \text{durchschnittliche Genexpression über alle Proben [counts]}}{\text{Standardabweichung}}$$

Dementsprechend zeigen die Farben in der *Heatmap* das Maß der Änderung an, nicht das Expressionslevel selbst, und es können nur Vergleiche zwischen den Proben, nicht aber zwischen den Genen einer Probe gezogen werden.

Enrichment – Globale Analyse der durch DEG beeinflussten biologischen Prozesse

Schließlich wurde eine globale Analyse der biologischen Prozesse angefertigt, die durch die differenzielle Genexpression am stärksten beeinflusst wurden. Diese Analyse wird auch *Enrichment* genannt.

Besonders bei diesem Analyseschritt können viele unterschiedliche statistische Tests und bioinformatische Tools verwendet werden, was eine direkte Auswirkung auf die ermittelten Signalwege haben kann. Es wurden mehrere *Enrichment*-Methoden getestet, welche teilweise unterschiedliche biologische Prozesse als *enriched* (von engl. *enriched*, zu Deutsch: auf Grundlage einer *Enrichment*-Analyse als statistisch signifikant durch DEG beeinflusst angesehen) aufgezeigt haben. Zwei Überrepräsentationsanalysen (engl. *over-representation analysis* = ORA) und ein *Scoring* nach funktionellen Klassen (engl. *functional class scoring* = FCS) wurden durchgeführt:

1. ORA mit Gene Ontology (GO)-Datenbank in OmicsBox mit FatiGO (Al-Shahrour et al., 2004)
2. ORA mit reactome-Datenbank im Browser auf reactome.org (Details in Tabelle 22)
3. FCS mit KEGG- und reactome-Datenbanken in R mit mitch (Kaspi & Ziemann, 2020)

In den ORA wurde der Anteil der differenziell exprimierten Gene eines biologischen Prozesses ($\text{DEG} = \log\text{FC} \neq 0$; $\text{FDR} \leq 0,05$ in edgeR) in Relation zur gesamten Anzahl der in diesen biologischen Prozess involvierten Gene bewertet. Wenn der Anteil an DEG im Prozess hoch genug war, wurde der biologische Prozess als überrepräsentiert angesehen (reactome: Binomialtest, $p \leq 0,05$, FatiGO: Fisher's Exact Test, $p \leq 0,05$ Al-Shahrour et al., 2004; Fabregat et al., 2017). Die Wahrscheinlichkeit, dass die auf diese Weise ermittelten Prozesse somit in den verglichenen Proben signifikant unterschiedlich abliefen, war sehr hoch, wurde jedoch noch durch die Benjamini-Hochberg-Methode getestet. Daraus ergab sich neben dem p-Wert aus der ORA eine Falscherkennungsrate (engl. *false discovery rate* = $\text{FDR} \leq 0,05$), oder auch korrigierte Überrepräsentations-wahrscheinlichkeit, aus dem Benjamini-Hochberg-Test (Fabregat et al., 2017).

Beim FCS wurden alle Gene anhand ihrer Expressionsdaten bewertet und in einer Rangliste sortiert, nicht nur die nach edgeR signifikanten DEG. Darauf folgte ein statistischer Test zur Identifizierung von *enrichen* Genen im oberen sowie unteren Extrem der Rangliste (hier mit: rank MANOVA, $p \leq 0,05$). Auch die FCS-Daten wurden durch die Benjamini-Hochberg-Methode abermals getestet ($FDR \leq 0,05$; Kaspi & Ziemann, 2020).

Da die Analyse mit reactome zwei wichtige Ergebnisse aus den beiden anderen Analysemethoden widerspiegelte und die Visualisierung sowohl intuitiver verständlich als auch detailreicher ist, wurde die Analysemethode ORA mit reactome gewählt (für Details siehe Limitationen und Ausblick). Die reactome-Datenbank wird stetig nach neustem Stand der Forschung manuell aktualisiert, ist *open-source* und *peer-reviewed*. Neben der Signalweganalyse von RNA-Seq-Daten per ORA gibt reactome die Möglichkeit die Gesamtheit des Wissens über zusammenhängende biologische Prozesse zu visualisieren oder die Erkenntnisse aus dem *Enrichment* im Kontext aller biologischen Prozesse darzustellen. In dieser Arbeit wurden Reacfoam-Abbildungen genutzt, die die Gesamtheit bekannter biologischer Prozesse in schaumähnlicher Form abbilden (engl. *foam* = Schaum) und die *enrichen* Prozesse gemäß des p-Werts der ORA farblich hervorheben.

Tabelle 22: Details zum *Enrichment* mit reactome. DEG: differenziell exprimierte Gene; DEA: Differenzielle Genexpressionsanalyse, Reacfoam: Visualisierung biologischer Prozesse der reactome-Datenbank mit schaumähnlichem Aufbau (engl. *foam*, zu Deutsch Schaum; vgl. Abbildung 22, Abbildung 23).

Name	<i>Enrichment</i>
Analysetyp	Überrepräsentations-Analyse (engl. <i>over-representation analysis</i> = ORA)
Art des Tools	Webapplikation (auch möglich mit R)
Input	Listen der DEG, getrennt nach hoch- und herunterreguliert, ohne Expressionsdaten o. ä.
Datenbank	reactome (UNIPROT, ENSEMBL)
Statistischer Test	Binomialtest (ORA, $p \leq 0,05$), Benjamini-Hochberg (FDR, $p \leq 0,05$)
Output	Überrepräsentierte biologische Prozesse und u. a. p-Wert; FDR; Top25 <i>enrichter</i> Prozesse mit Signalwegdiagrammen, Beschreibung sowie Liste beteiligter Gene; Signalwegübersicht z. B. als Reacfoam
Literatur	Fabregat et al., 2017 (optimierte ORA), Gillespie et al., 2022 (neustes Update zur Datenbank)

Die Analyse der biologischen Prozesse erfolgte getrennt nach den Listen höher oder niedriger exprimierter Gene der jeweiligen gepaarten DEA. Dementsprechend wurden vier globale Analysen biologischer Prozesse durchgeführt:

1. In 2D-DMEM/F12-EGF gegenüber 2D-DMEM10 höher exprimierte Gene
2. In 2D-DMEM/F12-EGF gegenüber 2D-DMEM10 niedriger exprimierte Gene
3. In 3D-DMEM/F12-EGF gegenüber 2D-DMEM/F12-EGF höher exprimierte Gene
4. In 3D-DMEM/F12-EGF gegenüber 2D-DMEM/F12-EGF niedriger exprimierte Gene

Diese vier vergleichenden Analysen wurden einzeln in Reacfoam-Abbildungen visualisiert und mithilfe der zugrunde liegenden *enrichten* Gengruppen sowie den enthaltenen Genen und ihrer Expressionswerte ausgewertet wie oben beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss epithelialer Differenzierungsmedien auf humane Parotis-abgeleitete Stammzellen

Um ein geeignetes Differenzierungsmedium für ein zelluläres Speicheldrüsenmodell aus humanen Parotis-abgeleiteten Stammzellen (hPDSCs) zu finden, wurden die Zellen zunächst in epithelialen Medien kultiviert. Die beiden Medien DMEM/F12-EGF und KSFM wurden bereits zur epithelialen Differenzierung von Schweißdrüsenzellen oder in der Kultur von Speicheldrüsenzellen eingesetzt.

Das Ausgangsmaterial aller Experimente waren hPDSCs, deren Stammzellartigkeit durch Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper für Nestin geprüft worden war (nicht in der Arbeit abgebildet).

Morphologie sowie Wachstumsverhalten der Zellen wurden beobachtet und mittels qRT-PCR wurde getestet, ob hPDSCs unter Einfluss der epithelialen Medien Marker für epitheliale Speicheldrüsenzellen exprimieren und diese somit zur Differenzierung der hPDSCs beitragen können.

VERÄNDERTE MORPHOLOGIE UND WACHSTUMSVERHALTEN DER HPDSCS IN DMEM/F12-EGF UND KSFM

Die Kultur in epithelialen Differenzierungsmedien veränderte die Morphologie sowie das Wachstumsverhalten der hPDSCs. Im Standardmedium DMEM10 verdreifachten sich die hPDSCs in etwa einer Woche (Aussaat 1:3, nach 7 ± 3 Tagen konfluent). Die hPDSCs unterschieden sich morphologisch bereits geringfügig je nach Probe/Isolation; die typische Zellform der hPDSCs war jedoch in allen hPDSC-Linien in adhärenter DMEM10-Kultur spindelförmig mit wenigen Ausläufern (siehe Abbildung 4, linke Spalte). In DMEM/F12-EGF kultivierte hPDSCs erschienen flacher, ramifizierter und proliferierten schneller (siehe Abbildung 4, mittlere Spalte). Im KSFM hingegen proliferierten hPDSCs kaum. Die spindelförmige Form der hPDSC wurde noch schmaler, wirkte höher, als zögen sich die Zellen zusammen; die Ausläufer erschienen sehr dünn; manche Zellen

blieben länglich, andere rundeten sich eher ab und wiesen kugelige Soma auf (siehe Abbildung 4, rechte Spalte). In KSFM erreichten hPDSCs nach Medienumstellung keine Konfluenz mehr; nach 7 Tagen oder sobald die Tendenz zu negativem Wachstum erkennbar war, wurden sie zur RNA-Extraktion geerntet.

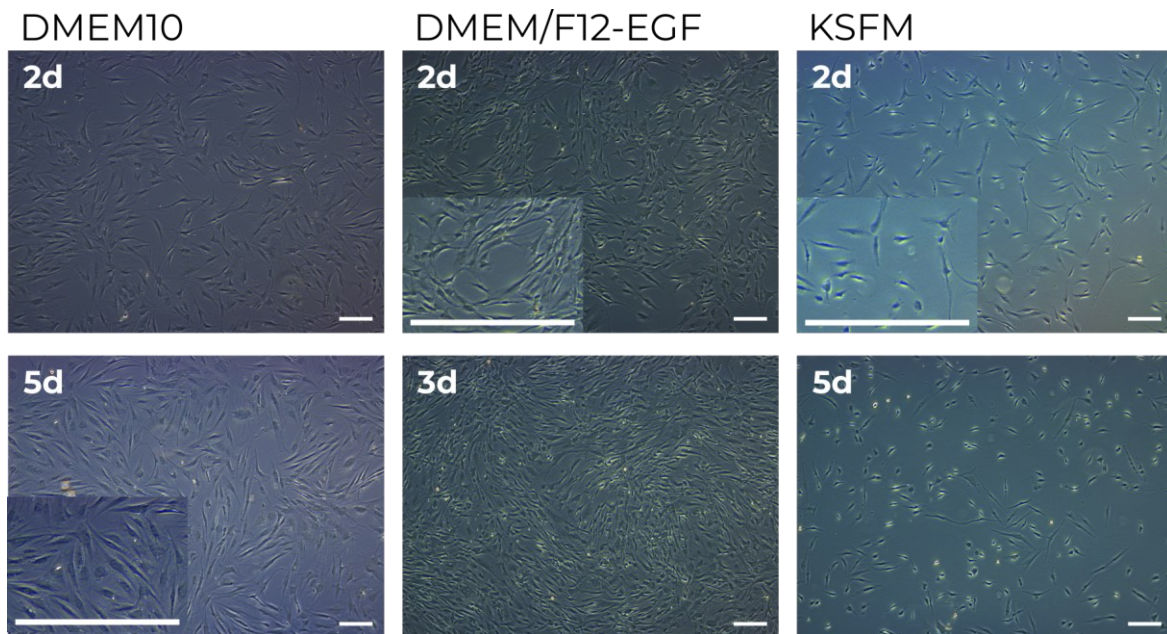


Abbildung 7: Wachstumsverhalten und Morphologie der hPDSCs änderten sich in epithelialen Differenzierungsmedien. Durchlichtmikroskopiebilder im Laufe der Zellkultur. Die gezeigte Konfluenz ist repräsentativ für das Wachstumsverhalten der hPDSCs in dem jeweiligen Medium: im Standard-Stammzellmedium DMEM10 proliferierten hPDSCs so, dass sie etwa innerhalb einer Woche konfluent waren (linke Spalte); in DMEM/F12-EGF schneller, sodass sie innerhalb weniger Tage konfluent waren (mittlere Spalte); in KSFM erreichten hPDSCs nach Medienumstellung keine Konfluenz mehr (rechte Spalte). hPDSCs unterschieden sich morphologisch geringfügig je nach Probe/Isolation (hier nur hPDSC3); die Morphologie zwischen hPDSCs in Standard- und Differenzierungsmedien unterschied sich stärker; DMEM10 (linke Spalte): spindelförmig, aber noch relativ flach, wenige Ausläufer; DMEM/F12-EGF (mittlere Spalte): flacher, mehr Ausläufer, die auch über andere Zellen wachsen; KSFM (linke Spalte): kugeliges Soma, wenige, dünnere Ausläufer. d = Tage; Maßstabsbalken 100 μm .

VERGLEICH DER MARKERGEN-EXPRESSION VON hPDSCs IN EPITHELIALEN DIFFERENZIERUNGSMEDIEN

Zur Charakterisierung der Genexpression von hPDSCs aus adhärenter Kultur in Differenzierungsmedien wurden qRT-PCRs mit ausgewählten Primern für speicheldrüsen-spezifische Markergene durchgeführt.

Die Expression des Stammzellmarkers Nestin blieb in hPDSCs in DMEM/F12-EGF und KSFM erhalten

Neben der Untersuchung speicheldrüsenspezifischer Marker wurde die Stammzellartigkeit der Zellen mit Primern für den Stammzellmarker Nestin geprüft. Das Ergebnis der qRT-PCR zeigte, dass hPDSCs die Nestin-Genexpression nicht nur aufrechterhielten, sondern dass diese in hPDSCs in DMEM/F12-EGF sogar signifikant erhöht wurde (Abbildung 8). In KSFM kultivierte hPDSCs exprimierten Nestin in unverändertem Maße.

Die Expression speicheldrüsenspezifischer Marker in hPDSCs wurde nicht durch DMEM/F12-EGF und KSFM erhöht

Die sekretorischen Markergene CHRM3, TMEM16A und das seröse Markergen α -Amylase 1 waren in allen drei Konditionen exprimiert (Abbildung 8). Der letzte untersuchte sekretorische Marker AQP5 hingegen wurde nur in DMEM10 und KSFM, nicht in DMEM/F12-EGF exprimiert. CFTR wurde nur in DMEM10 exprimiert.

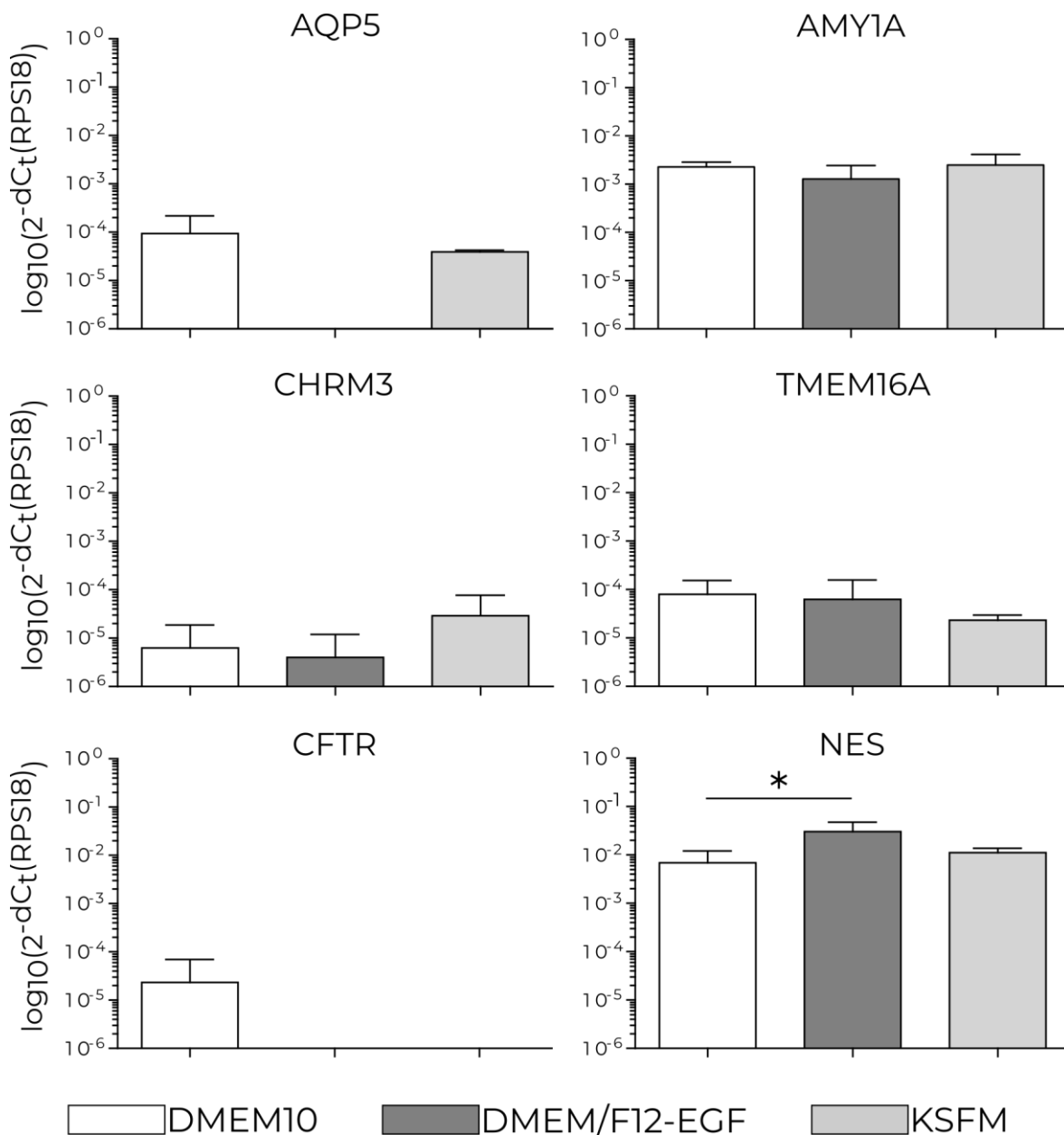


Abbildung 8: Adhärenz kultivierte hPDSCs änderten die mRNA-Expression von Stammzell- als auch speicheldrüsenspezifischen Markern in epithelialen Differenzierungsmedien geringfügig. Genexpressionsdaten aus qRT-PCR relativ zum Haushaltsgen RPS18. hPDSCs aus Passagen < 10; wenn möglich, bis zur Konfluenz kultiviert, max. aber 7 d. Kruskal-Wallis-Test, *post hoc* Dunn-Test: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medienkonditionen ($p > 0,05$) außer bei Nestin: Kruskal-Wallis-Test $p = 0,0238$; *post hoc* Dunn-Test: 2D-DMEM10 vs. 2D-DMEM/F12-EGF signifikant ($p < 0,05$). n (DMEM10, DMEM/F12-EGF) = 4; n (KSFM) = 3.

Die Kultivierung der hPDSCs in DMEM/F12-EGF und KSFM hat keine signifikanten Differenzierungsfortschritte der hPDSCs zu funktionalen Speicheldrüsenzellen gezeigt. Die folgenden Experimente wurden deswegen zunächst in allen drei möglichen Kulturmedien

durchgeführt, um weitere Informationen zu den optimalen Kulturkonditionen eines zellulären Speicheldrüsenmodells zu sammeln.

3.2 Der Einfluss von 3D-Kultur auf hPDSCs

Um herauszufinden, ob die 3D-Kultur einen Einfluss auf den Differenzierungszustand der hPDSCs hat, wurden hPDSCs für 7 Tage in Agarose-Multiwell-Platten (AMP) kultiviert. So konnte getestet werden, ob Zell-Zell-Kontakte, die Abwesenheit von synthetischem Substrat und andere Faktoren in 3D-Kultur positiv zur Differenzierung der hPDSCs zu einem Speicheldrüsenmodell beitragen.

MORPHOLOGIE UND WACHSTUM DER hPDSC-SPHÄROIDE IN UNTERSCHIEDLICHEN KULTURMEDIEN

Zellsuspensionen mit Standardmedium DMEM10 sowie Differenzierungsmedien DMEM/F12-EGF und KSFM wurden in AMPs gegeben, um die hPDSCs dreidimensional zu kultivieren. In allen drei Medien formten sich über Nacht in den Mulden der AMPs Sphäroide aus den hPDSCs. Am ersten Tag nach Aussaat sind in allen drei Medien noch einzelne Zellen am Boden der Mulden zu sehen und die Oberfläche der Sphäroide ist überwiegend uneben (Abbildung 9, erste Reihe).

Das beeinflusste auch die Größenmessung der Sphäroide. Die Durchlichtmikroskopieaufnahmen wurden genutzt, um die sichtbare Fläche der Sphäroidaufsicht und somit die Sphäroidgröße zu messen. In DMEM10 war die Aufsichtsfläche der Sphäroide am ersten Tag der Kultur am größten im Vergleich zu den anderen Tagen der Kultur (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10). Das legte der Unterschied der Aufsichtsflächen der Sphäroide über die Zeit hinweg nahe (ANOVA mit Messwiederholung, $p = 0,0432$). Es ließ sich jedoch keine Aussage darüber treffen, welche Konditionen an welchen Tagen sich signifikant unterscheiden (*post hoc* Bonferroni-Test, $p > 0,05$). Ab Tag 3 schienen die Sphäroide keine Größenveränderung mehr zu zeigen. An Tag 3 der 3D-Kultur waren, unabhängig vom Medium, weniger Zellen am Boden der Mulden erkennbar; die Oberfläche der Sphäroide in DMEM10 und DMEM/F12-EGF war überwiegend glatt und rund mit wenigen Strukturauffälligkeiten wie z. B. Auswölbungen (Abbildung 9, zweite Reihe) oder eine eher längliche

Form. Außerdem waren dunkle Stellen innerhalb mancher Sphäroide zu sehen (Abbildung 9, Pfeilspitzen).

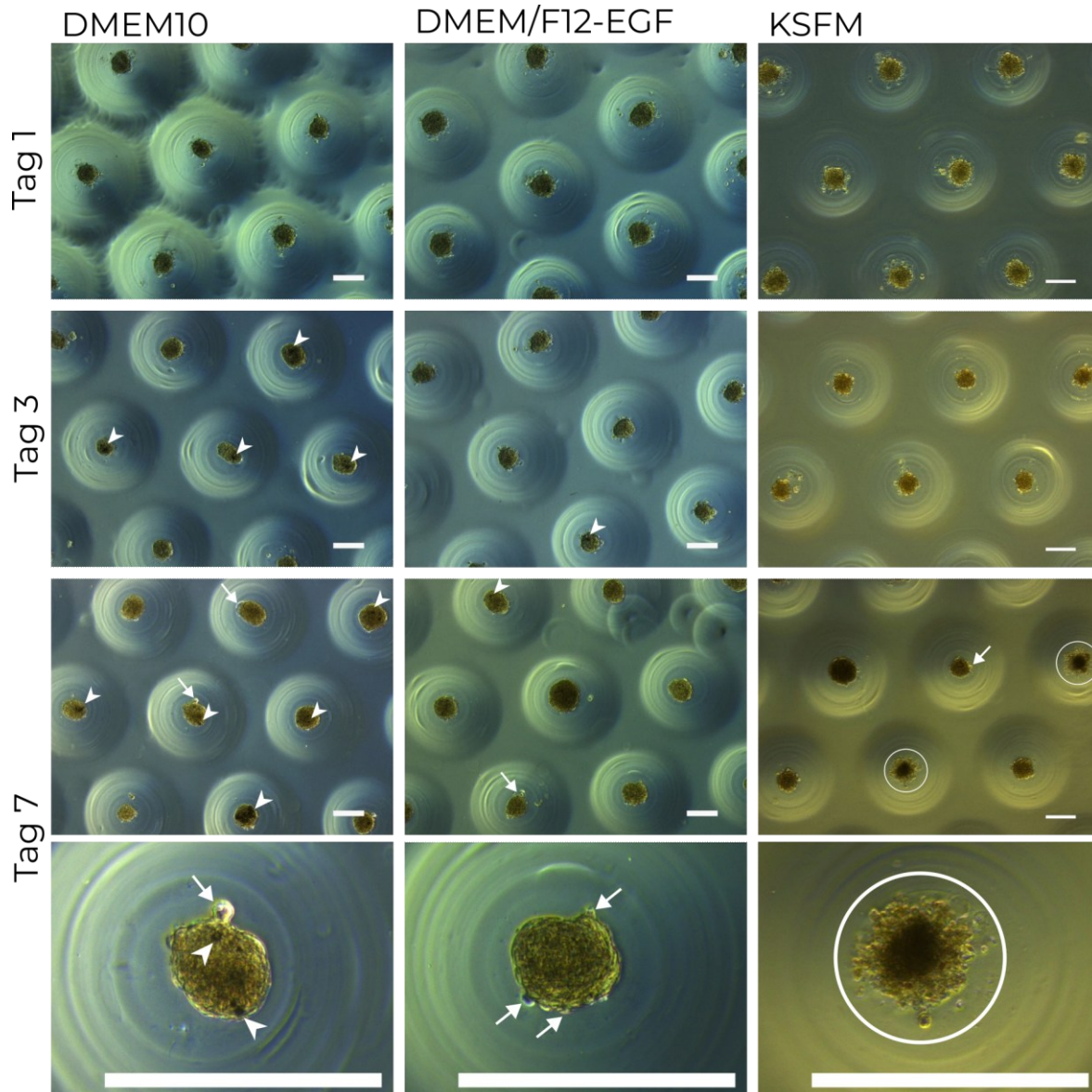


Abbildung 9: hPDSCs ließen sich über 7 Tage dreidimensional als Sphäroide in AMP kultivieren.

Repräsentative Durchlichtmikroskopieaufnahmen der 3D-Kultur von hPDSC1. Tag 1: Oberfläche der Sphäroide noch uneben. Tag 3: Oberfläche der meisten Sphäroide glatter, mit auffälligen Strukturen wie Ausstülpungen (Pfeile); erste Unterschiede zwischen den Kulturmedien: in DMEM10 vermehrt dunkle Stellen innerhalb der Sphäroide (Pfeilspitzen). Tag 7: Unterschiede zwischen den Kulturmedien deutlich: in KSFM lösten sich einige Sphäroide auf (Kreise); in DMEM10 und DMEM/F12-EGF blieben sie kompakt; in DMEM/F12-EGF waren die Sphäroide tendenziell größer. Maßstäbe: oben 200 μm ; letzte Reihe: 100 μm .

Sphäroide aus der Kultur in DMEM/F12-EGF wirkten größer als die in den anderen beiden Medien

In DMEM/F12-EGF wirkten die Sphäroide größer als in den anderen Medien. Dieser Eindruck ließ sich zwar nicht signifikant belegen; aber die Sphäroide aus DMEM/F12-EGF-Kultur schienen nicht wie die in DMEM10-kultivierten Sphäroide in den ersten 3 Tagen der Kultur zu schrumpfen (Abbildung 10). Die Größe der Sphäroide in DMEM/F12-Kultur war relativ gleichbleibend über die 7 Tage der Kultur hinweg. Bei Betrachtung der Form der Sphäroide zeigte sich, dass sich auch die Oberfläche der DMEM/F12-EGF-Sphäroide während der Kultur änderte: Wie in allen Medien befanden sich einen Tag nach der Aussaat noch losere Zellgebilde in den Mulden der AMP oder große Blasen an den Sphäroiden. An Tag 3 und 7 jedoch waren besonders in DMEM10 und DMEM/F12-EGF runde Sphäroide zu finden.

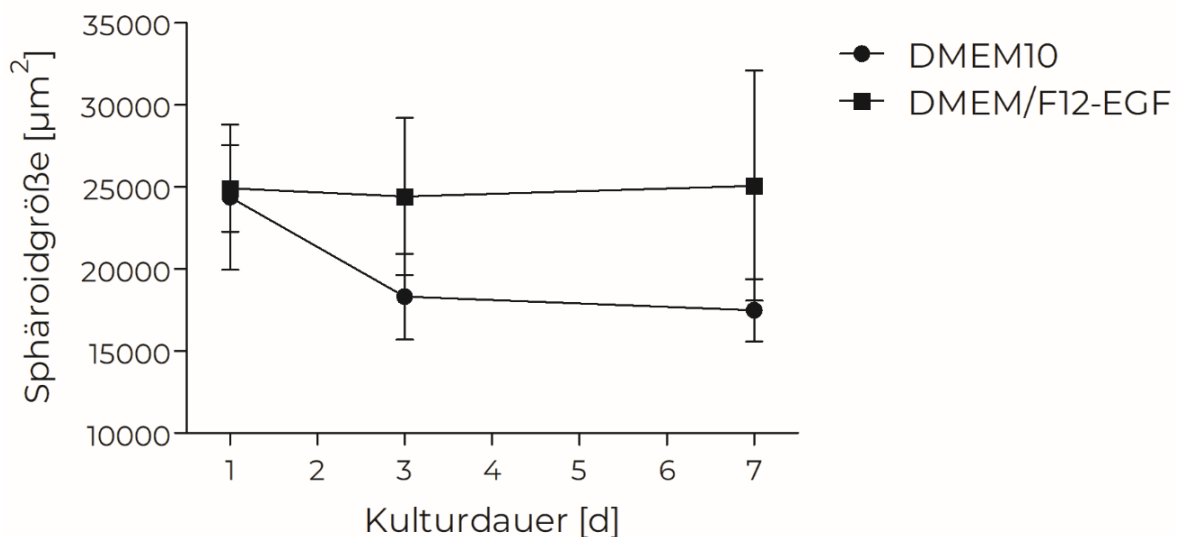


Abbildung 10: Die hPDSC-Sphäroide in DMEM10 schienen in den ersten Tagen der Kultur kleiner zu werden; in DMEM/F12-EGF-Kultur zeigten die hPDSC-Sphäroide keine deutliche Größenveränderung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Fläche der Aufsicht von mind. 6 zufällig ausgewählten Sphäroiden pro hPDSC-Linie an Tag 1, 3 und 7 der 3D-Kultur (vgl. Abbildung 9). Messung per Bereichsauswahl (Kontur polygonal) in ZEN lite (*blue edition*) in Durchlichtmikroskopieaufnahmen. ANOVA: p (Zeitfaktor) $< 0,05$, *post hoc* Tukey $p > 0,05$. $n = 3$ biologische Replikate.

In KSFM kultivierte hPDSCs bildeten weniger kompakte Sphäroide als hPDSCs in DMEM10 und DMEM/F12-EGF

Die in KSFM kultivierten Sphäroide wiesen auch an Tag 3 noch sehr unebene Oberflächen und lose Zellen in den Mulden auf (Abbildung 9, zweite Reihe, rechts). Am siebten Tag der Kultur in AMPs zeigten sich die Unterschiede zwischen den Serumgehalten noch deutlicher: In DMEM10 und DMEM/F12-EGF befanden sich vorwiegend runde Sphäroide mit einigen Strukturauffälligkeiten. In KSFM waren zwar ebenso runde Sphäroide mit Strukturauffälligkeiten wie Auswölbungen zu finden (Abbildung 9, dritte Reihe, rechts: Pfeil). Aber auffallend viele Mulden der AMPs beinhalteten am siebten Tag der Kultur in KSFM lose Zellansammlungen (Abbildung 9, dritte Reihe, rechts: Kreise). Deswegen wurde davon abgesehen die Sphäroide aus KSFM-Kultur in die Flächenmessung für Abbildung 9 einzubeziehen. Außerdem wurden im Folgenden Vitalitätsassays angefertigt, um herauszufinden, ob die losen Zellansammlungen aus lebenden Zellen bestanden.

VITALITÄT DER 3D-KULTUREN AUS HPDSCS

Um herauszufinden, welches Medium am besten für die 3D-Kultur in AMPs geeignet ist, wurde die Vitalität der Sphäroide mithilfe von Lebend-Tot-Färbungen mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) bestimmt. Die Vitalität wurde sowohl quantifiziert über die Gesamtheit der AMPs als auch im Detail innerhalb der einzelnen Sphäroide betrachtet.

Hohe Vitalität bei hPDSC-Sphäroiden nach 7 Tagen in serumhaltiger 3D-Kultur

Zur Quantifizierung der Vitalität der Sphäroide wurden diese am siebten Tag der Kultur direkt in den AMPs mit FDA und PI gefärbt und Übersichtsbilder durch Mosaikaufnahmen am Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 erstellt (Abbildung 11). Die in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierten Sphäroide zeigten nahezu alle eine FDA-Färbung, sind also vital (Abbildung 11, oben links; Abbildung 12, links). Die Mulden, die keine FDA-Färbung aufwiesen, enthielten keine Zellen mehr, was in Zellkern-Färbungen mit Hoechst deutlich wird (hier nicht gezeigt). Nur wenige Sphäroide, die in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultiviert wurden, sind

auch in der Übersichtsaufnahme erkennbar PI-positiv, was erst bei starker Vergrößerung der Übersichtsaufnahme sichtbar wurde (Vergrößerung hier nicht gezeigt).

In KSFM kultivierte Sphäroide wurden deutlich häufiger durch PI angefärbt (Abbildung 11, unten rechts; Abbildung 12, rechts) und die FDA-Färbung im AMP wies mehr Lücken auf als die der AMPs in DMEM10 und DMEM/F12-EGF (Abbildung 11, oben).

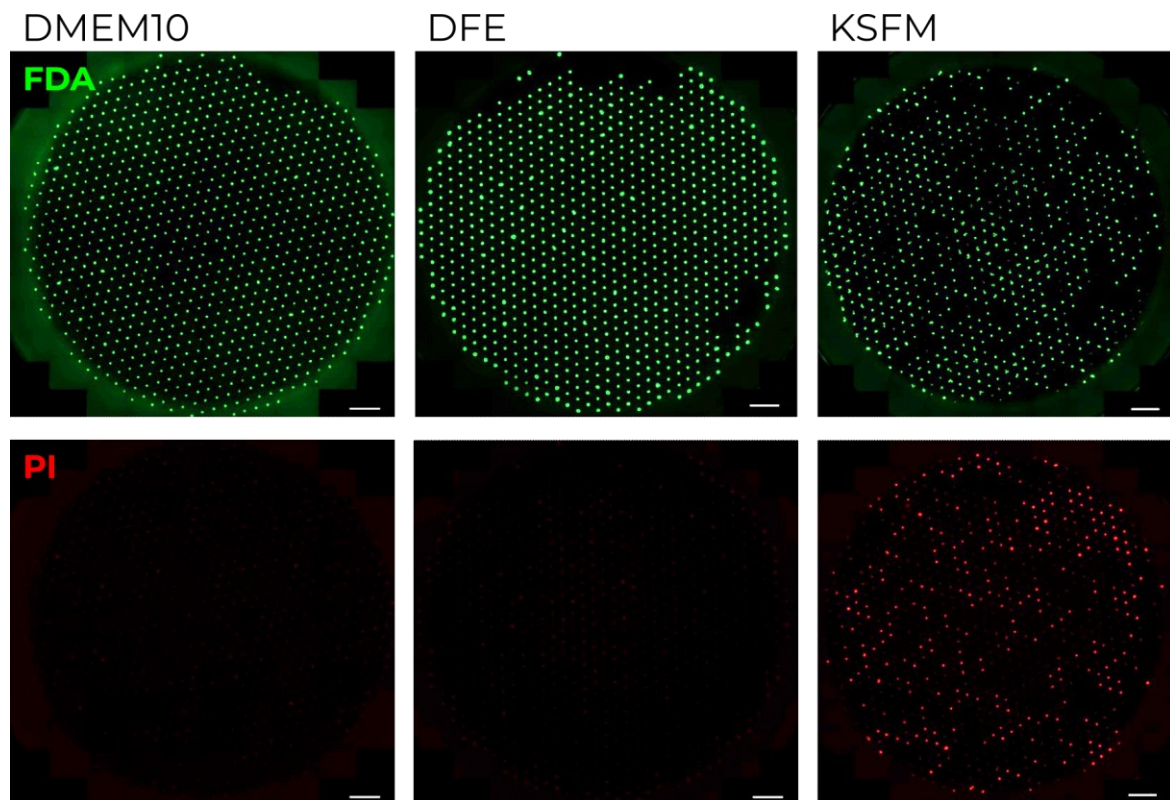


Abbildung 11: Die in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierten Sphäroide wiesen eine hohe Vitalität auf, die in KSFM kultivierten Sphäroide eine geringe Vitalität. Repräsentative Übersichtsaufnahmen der Lebend-Tot-Färbung gesamt AMP an Tag 7. Grün: Fluoresceindiacetat (FDA), Vitalitätsmarker; rot: Propidiumiodid (PI), Zelltodmarker. In DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierte Sphäroide erschienen ausschließlich vital; es ist keine PI-Färbung in dieser Vergrößerung zu erkennen. Die Vertiefungen ohne FDA-Färbung sind in den serumhaltigen Medien zumeist leer (Abgleich mit Hoechst-Kernfärbung nicht gezeigt). Maßstabsbalken 2 mm.

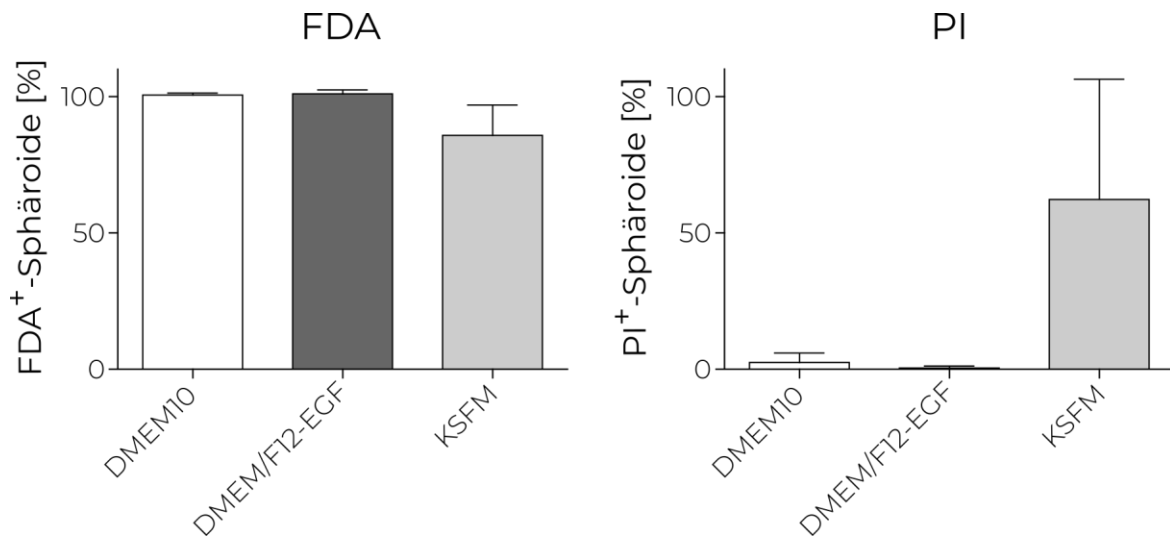


Abbildung 12: Der Anteil der PI-positiven Sphäroide in KSFM war höher als in DMEM10 und DMEM/F12-EGF. Zahl der FDA⁺- und PI⁺- Sphäroide pro AMP bezogen auf die Zahl der Hoechst⁺-Sphäroide pro AMP; gezählt anhand der Übersichtsaufnahmen der Lebend-Tot-Färbung von Tag 7 der 3D-Kultur (siehe repräsentative Aufnahmen in Abbildung 11). Kruskal-Wallis-Test, *post hoc* Dunn-Test $p > 0,05$. n (DMEM10, DMEM/F12-EGF) = 2; n (KSFM) = 4.

Nur vereinzelt tote Zellen in hPDSC-Sphäroiden nach 7 Tagen in serumhaltiger 3D-Kultur

Neben der Quantifizierung der Vitalität der Sphäroide wurde auch analysiert, ob die überwiegend vital erscheinenden Sphäroide in DMEM10- und DMEM/F12-EGF-Kultur geringe Mengen an toten Zellen beinhalteten und wo diese in den Sphäroiden verortet waren. Dazu wurden zufällig ausgewählte Sphäroide mit FDA und PI gefärbt und am LSM mikroskopiert.

Sowohl in DMEM10 als auch in DMEM/F12-EGF kultivierte Sphäroide wiesen vereinzelt PI- positive Zellen auf, diese waren jedoch nicht auf eine bestimmte Lokalisierung innerhalb der Sphäroide beschränkt (Abbildung 13, links und Mitte). Die Sphäroide aus DMEM10- und DMEM/F12-Kultur waren überwiegend intakt und FDA-gefärbt. In der zufälligen Auswahl der Sphäroide aus KSFM-Kultur konnte kein intaktes Sphäroid mit FDA-Färbung gefunden werden. Das gezeigte Sphäroid aus KSFM-Kultur erschien aufgelöst und wies nur bruchstückhafte Kernfärbungen durch Hoechst und PI auf (Abbildung 13, rechts).

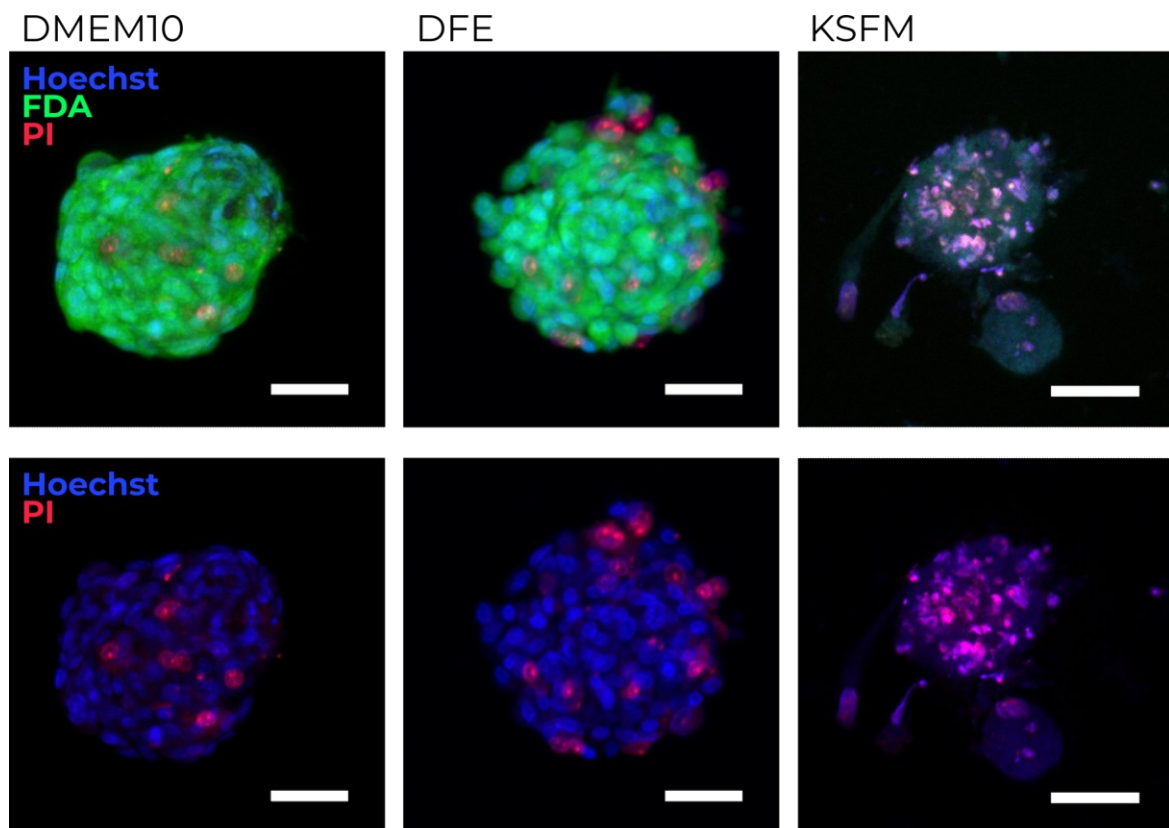


Abbildung 13: Die in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierten Sphäroide waren überwiegend vital und enthielten keinen nekrotischen Kern. Repräsentative Detailaufnahmen der Lebend-Tot-Färbung an Tag 7 zufällig ausgewählter Sphäroide (DMEM10 und DMEM/F12-EGF aus hPDSC3, KFSM aus hPDSC4); orthogonale Projektion der Z-Stapel. Grün: Fluoresceindiacetat (FDA), Vitalitätsmarker; rot: Propidiumiodid (PI), Zelltodmarker; blau: Hoechst, Zellkernmarker. Mikroskopiert in Cell-Tak™-beschichteten ibidi-Schalen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. In DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierte Sphäroide zeigten eine gleichmäßige FDA-Färbung, wohingegen in KFSM kultivierte Sphäroide keine FDA-Färbung aufwiesen, sondern ausschließlich ungleichmäßige Kernfärbung mit Hoechst sowie PI. Die vereinzelten PI-positiven Zellen in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierten Sphäroiden waren nicht auf eine bestimmte Lokalisation begrenzt. Maßstab 50 μm .

Nur in DMEM/F12-EGF kultivierte Sphäroide eigneten sich für RNA-Analysen

Die geringe Vitalität der in KFSM kultivierten Sphäroide ließ es nicht zu, ausreichend mRNA für eine umfassende qRT-PCR-Analyse zu extrahieren. Die RNA-Extraktion der Sphäroide, die im Standardmedium DMEM10 kultiviert wurden, stellte sich ebenfalls problematisch dar: es konnte keine Extraktionsmethode etabliert werden, die zu ausreichend großen RNA-Mengen von hoher Qualität führte. Bereits zuvor zeigten Experimente mit Sphäroiden aus Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen kultiviert mit derselben 3D-Kultur-Methode im selben Medium ähnliche Komplikationen bei der RNA-Extraktion. Die aufgereinigte RNA-Konzentration war nicht

ausreichend für vollumfassende Analysen wie eine RNA-Seq. Aufgrund dieser technischen Einschränkungen und den Vorteilen in Vitalität und Proliferation, die in DMEM/F12-EGF kultivierte hPDSCs und Sphäroide zeigten, wurden die weiterführenden Experimente nur mit den folgenden drei Konditionen fortgesetzt:

1. Standardkultur humaner Parotis-abgeleiteter Stammzellen (hPDSCs):
adhärent in DMEM10 kultiviert (2D-DMEM10)
2. Durch Medium für epitheliale Zellen differenzierte hPDSCs:
adhärent in DMEM/F12-EGF kultiviert (2D-DMEM/F12-EGF)
3. hPDSC-Sphäroide:
dreidimensional in DMEM/F12-EGF kultiviert (3D-DMEM/F12-EGF)

GENEXPRESSIONSANALYSE AUSGEWÄHLTER MARKER

Um einen ersten Eindruck zum Differenzierungsstatus der hPDSCs zu erhalten, wurde deren Genexpression mit mRNA in qRT-PCRs untersucht. Dabei wurden Primer für ausgewählte Gene verwendet, die erste Aussagen über die Vitalität der hPDSC-Sphäroide und die Expression sekretorischer Markergene zuließen.

Die Expressionsdaten von Ki67 und Caspase 3 deuteten auf verringerte Proliferation bei unveränderter apoptotischer Aktivität in hPDSC-Sphäroiden hin

Um weitere Informationen über die Vitalität der in DMEM/F12-EGF kultivierten Sphäroide zu gewinnen, wurden die mRNA-Expression des Proliferationsmarkers Ki67 und des Apoptosemarkers Caspase3 (Cas3) mittels qRT-PCR untersucht und mit der Expression in adhärent kultivierten hPDSCs verglichen. Die Proliferation bzw. die Ki67-Expression war in adhärent wachsenden hPDSCs unverändert in DMEM10- und DMEM/F12-Kultur (Abbildung 14, links). In dreidimensional kultivierten hPDSCs in DMEM/F12-EGF gab es eine Tendenz zu verringerter Proliferation; die unveränderte Cas3-Expression ließ jedoch keinen Rückschluss auf vermehrte apoptotische Prozesse zu (Abbildung 14).

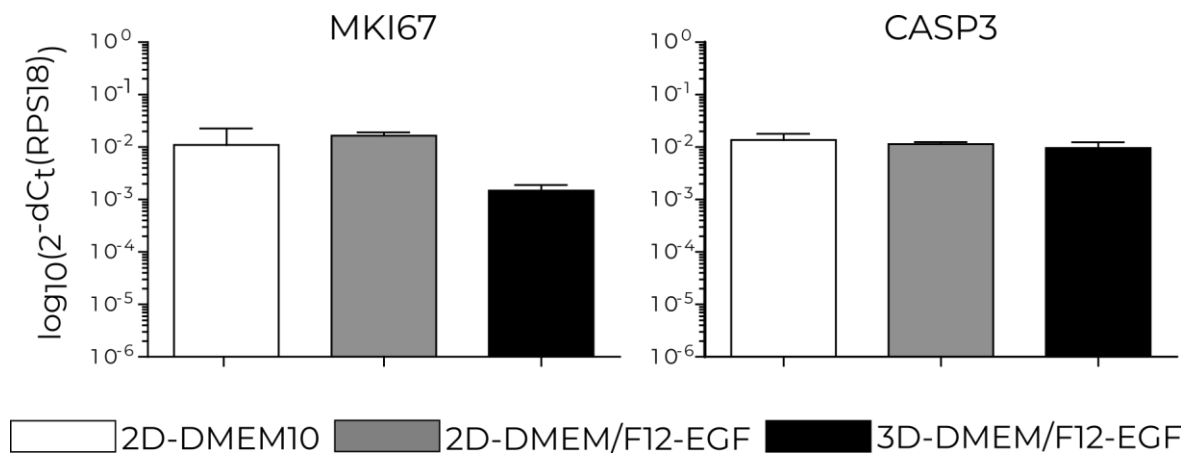


Abbildung 14: Die mRNA-Expression von Ki67 und Caspase 3 deuteten auf verringerte Proliferation in hPDSC-Sphäroiden gegenüber hPDSCs in adhärenter Kultur bei unveränderter apoptotischer Aktivität hin. Genexpressionsdaten des Proliferationsmarkers Ki67 und des Apoptosemarkers Caspase 3 aus qRT-PCR relativ zum Haushaltsgen RPS18. hPDSC1, 3 und 4 in P7-14 (n = 3); wenn möglich, bis zur Konfluenz kultiviert, max. aber 7 d. Kruskal-Wallis-Test, *post hoc* Dunn-Test: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturkonditionen (p > 0,05).

Dies bestätigte die Ergebnisse der Vitalitätsassays und die Auswertung der Sphäroidgrößen, in denen es keine Anzeichen von vermehrtem Zelltod in den Sphäroiden aus DMEM/F12-EGF-Kultur gab (vgl. Abbildung 9 bis Abbildung 13).

3D-Kultur in DMEM/F12-EGF erhöhte die Expression des azinusspezifischen Markers Aquaporin 5 in hPDSCs

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression einiger bekannter Speicheldrüsenmarker in den hPDSC-Sphäroiden mittels qRT-PCR untersucht und mit der Expression in adhären kultivierten hPDSCs verglichen. CHRM3 ist ein muskarinerg Rezeptor und somit essenziell für die cholinerge Stimulation der Speichelsekretion. In dem hier eingeführten Modell der hPDSC-Sphäroide wurde CHRM3-mRNA exprimiert (Abbildung 15). Entgegen den Ergebnissen des Medienvergleichs der adhären kultivierten hPDSCs in niedrigeren Passagen (siehe Abbildung 8) wurde in den adhären kultivierten hPDSCs im 2D-3D-Vergleich (höhere Passagen) kein CHRM3 exprimiert. Der Chloridkanal TMEM16A hingegen war sowohl in den undifferenzierten hPDSCs, den Sphäroiden aus DMEM/F12-EGF-Kultur als auch allen adhären in Differenzierungsmedien kultivierten hPDSCs exprimiert (Abbildung 8, Abbildung 15). Zwischen den Konditionen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Aquaporin 5 (AQP5), der dritte untersuchte Marker, der in die Speichelsekretion involviert ist, wurde hingegen differenziell exprimiert: in adhären kultivierten

hPDSCs ist AQP5 nur in 2D-DMEM10 exprimiert; nicht in 2D-DMEM/F12-EGF. In den hPDSC-Sphäroiden aus DMEM/F12-EGF jedoch war eine signifikant erhöhte AQP5-Expression festzustellen (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,0241$; Dunn-Test: $p < 0,05$ für 2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-EGF; $n = 3$). Der seröse Marker α -Amylase 1 (AMY1A) war in allen Konditionen des 2D-3D-Vergleichs gleichermaßen exprimiert. Eine Expression des Gangzellenmarkers CFTR war in keiner der hPDSCs im 2D-3D-Vergleich zu verzeichnen.

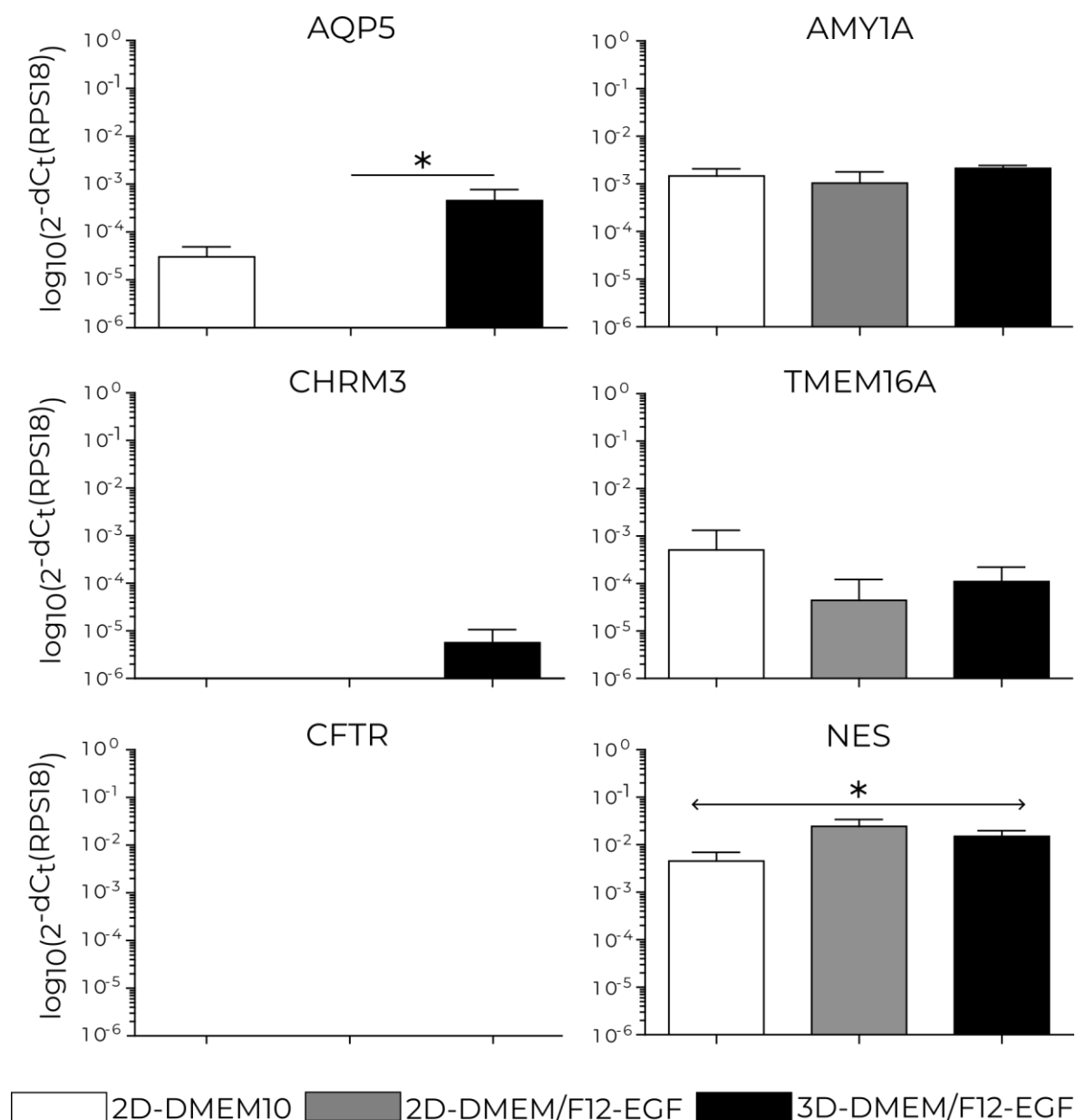


Abbildung 15: hPDSCs-Sphäroide aus DMEM/F12-EGF-Kultur exprimierten Stammzell- und Azini-spezifische Gene. Genexpressionsdaten einer qRT-PCR relativ zum Haushaltsgen RPS18. hPDSC1, 3 und 4 in P7-14 ($n = 3$); wenn möglich, bis zur Konfluenz kultiviert, max. aber 7 d. Kruskal-Wallis-Test, *post hoc* Dunn-Test: $p > 0,05$; außer bei AQP5: Kruskal-Wallis-Test $p = 0,0241$; Dunn-Test: $p < 0,05$ für 2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-

EGF und Nestin: Kruskal-Wallis-Test $p = 0,0332$; *post hoc* Dunn-Test zwischen allen paarweise verglichenen Konditionen: $p > 0,05$.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse speicheldrüsenpezifischer Marker deuteten darauf hin, dass die undifferenzierten hPDSCs bereits Eigenschaften azinärer Zellen besaßen, die sich durch die dreidimensionale Kultur im Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF verfestigen oder sogar verstärken ließen. Zur Evaluation dieser Ergebnisse auf Proteinebene wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt.

hPDSCs zeigten keine distinkten Immunfluoreszenzfärbungen der sekretorischen Marker

Zur Evaluation der Expression der azinus- und stammzellspezifischen Marker wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob das vorliegende Maß an mRNA-Expression zur Translation der Marker ausreichte und wo die entstehenden Proteine in den Zellen sowie den Sphäroiden verortet waren. Die Immunfluoreszenzfärbungen umfassten Antikörper von drei azinusspezifischen sekretorischen Markern: AQP5, TMEM16A und CHRM3. Leider wies keine der Färbungen distinkte Signale auf, die auf eine Translation der für die Speichelsekretion erforderlichen Proteine hindeuten könnten (siehe Anhang). Des Weiteren wurden die Expression von Nestin auf transkriptioneller und translationaler Ebene getestet.

hPDSCs erhielten die Expression des Stammzellmarkers Nestin in Kultur mit DMEM/F12-EGF sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur aufrecht

Die im Stammzellmedium DMEM10 kultivierten hPDSCs exprimierten auch in der höheren Passage zum Zeitpunkt der Sphäroidkultur Nestin-mRNA (Abbildung 15). In DMEM/F12-EGF-Kultur schien die Nestin-Expression in höheren Passagen sowohl in adhärenter als auch in dreidimensionaler Kultur zu steigen (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,0332$). Diese Tendenz stimmte mit der Untersuchung der Nestin Expression der hPDSCs aus adhärenter Kultur in niedrigen Passagen überein (Abbildung 8). Der *post hoc*-Test ließ jedoch keine Aussage darüber zu, welche der drei Konditionen im 2D-3D-Vergleich sich signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 15, Dunn-Test: $p > 0,05$).

Die Nestin⁺-Subpopulation befand sich überwiegend in äußeren Zellschichten der Sphäroide

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten nicht nur, dass Nestin in allen untersuchten Konditionen exprimiert wurde (Abbildung 16), sondern auch die Lokalisierung in den hPDSC-Sphäroiden: die Nestin-positiven hPDSCs befanden sich in der überwiegenden Mehrheit im äußeren Bereich des Sphäroids.

In allen Konditionen zeigte sich die typische filamentöse Struktur des Nestins in den Immunfluoreszenzfärbungen. Sowohl in den adhärennten Kulturen als auch in den Sphäroiden handelte es sich um Subpopulationen. In dem abgebildeten hPDSC-Sphäroid befand sich diese Subpopulation in einer Strukturauffälligkeit im äußeren Bereich des Sphäroids, die wie eine Ausstülpung oder Blase an der sonst glatten Oberfläche des Sphäroids erscheint. Die Nestin-positiven Zellen lagen oben auf dieser Strukturauffälligkeit auf (siehe Abbildung 16, unten); die Nestin-Filamente reichten bis auf den glatten Bereich der Sphäroidoberfläche. Im Inneren der Strukturauffälligkeit waren DAPI-gefärbte Zellkerne zu sehen; sie war demnach nicht hohl.

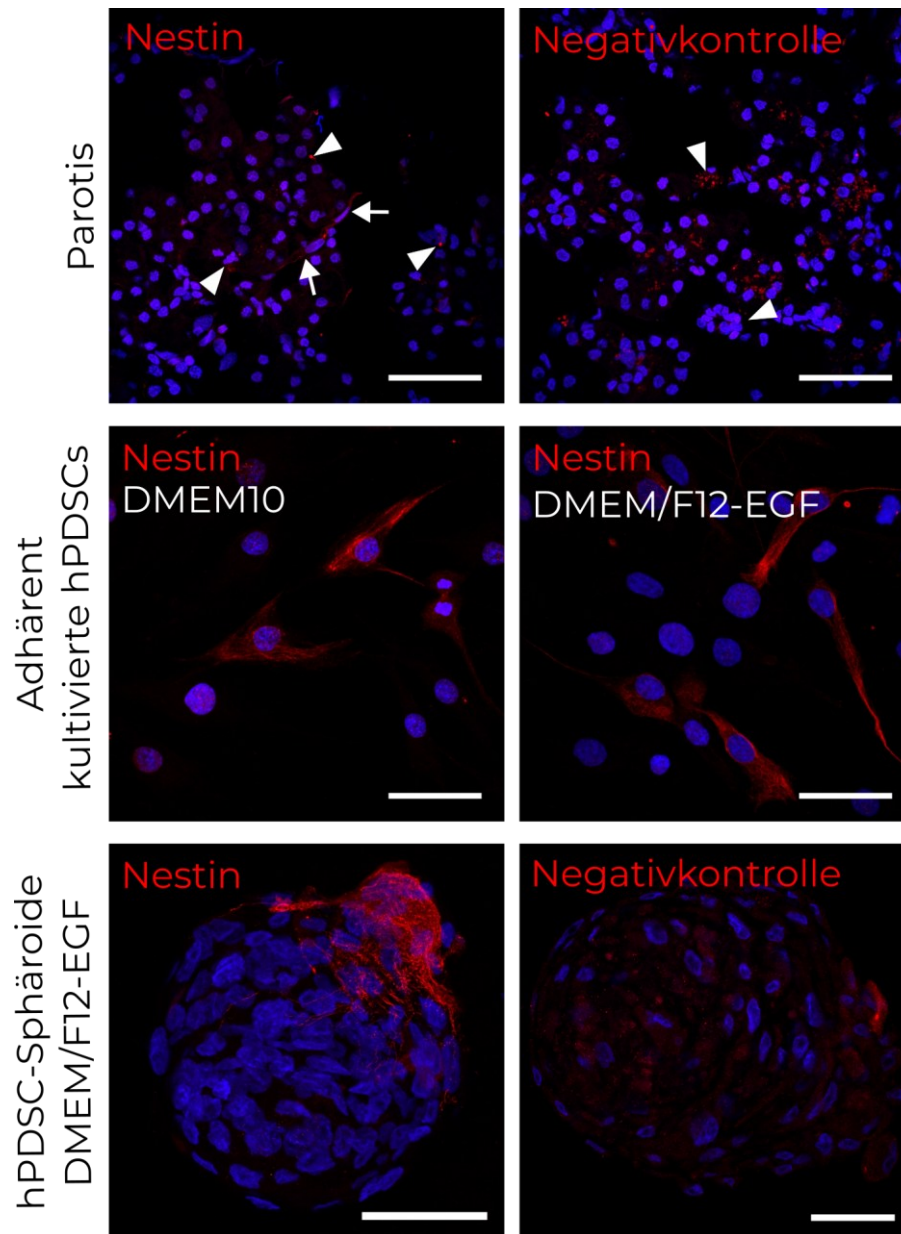


Abbildung 16: hPDSCs wiesen in allen Konditionen Nestin-positive Subpopulationen auf, die sich in hPDSC-Sphäroiden vorwiegend in äußeren Schichten befanden. Parotisschnitte (kryokonserviert, 12 μm), adhärenz kultivierte hPDSCs in DMEM10 und DMEM/F12-EGF sowie hPDSC-Sphäroide in DMEM/F12-EGF wurden mit monoklonalen Primärantikörpern für Nestin (aus Maus IgG1) und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (aus Ziege gegen Maus) gefärbt (rot). Negativkontrolle bestand in einer Färbung mit nicht spezifischen IgG1-Antikörpern aus Maus statt des Nestin-Primärantikörpers. In der Parotis lag Nestin in spindelförmigen Zellen zwischen den Azini (oben links). Die Negativkontrolle auf Parotis zeigte mittelgroße Einschlüsse von Cy3 im Zytoplasma (oben rechts). In den adhärenz wachsenden Zellen in beiden Medien (Mitte) waren Nestin⁺-hPDSCs zu finden. In hPDSC-Sphäroiden befanden sich die Nestin⁺-Zellen in der äußeren Schicht (unten links); hier befanden sich die Nestin⁺-hPDSCs vorwiegend in einer Auswölbung an der Oberfläche des ansonsten kugelförmigen Sphäroids (maximale Projektion); Negativkontrolle der Färbung auf Sphäroiden (unten rechts): ein Einzelbild aus der Mitte des Sphäroids. Maßstabsbalken 50 μm .

3.3 Vergleich der Genexpressionsprofile mittels explorativer Gesamttranskriptomanalyse

Um noch einen besseren Überblick über das Genexpressionsprofil der hPDSCs in unterschiedlichen Kulturkonditionen zu gewinnen, wurde schließlich eine explorative Gesamttranskriptomanalyse mittels RNA-Seq (kurz für RNA-Sequenzierung, wird in dieser Form verwendet für Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren) angefertigt. Die Sequenzierung wurde bei Biosearch™ Technologies durchgeführt.

Die von Biosearch™ Technologies erstellten Daten bestanden aus einer FASTQ-Datei je Probe, den äquivalenten Adapterrest-bereinigten FASTQ-Dateien sowie den zugehörigen FastQC v0.11.9-Berichten, Informationen zum Ablauf der Probenaufbereitung und Sequenzierung und einer Tabelle mit den Gesamtzahlen der *reads* pro Probe (roh und Adapterrest-bereinigt).

Die FastQC v0.11.9-Berichte belegten eine erfolgreiche Sequenzierung. Also wurden die *reads* in den Adapterrest-bereinigten FASTQ-Dateien anhand eines Referenzgenoms aligniert. Durchschnittlich wurden $85,64 \pm 0,47\%$ der *reads* eindeutig am Referenzgenom gemappt. Die eindeutig an einem *Feature* gemappten *counts* machten mit durchschnittlich $68,25\% \pm 1,63\%$ den Großteil der *reads* aus (Abbildung 17). Die *count*-Bibliotheken beinhalteten durchschnittlich $4.822.149 \pm 1506869$ *reads*.

Alle *reads* konnten einem Locus zugeordnet werden (keine „*Not Aligned*“, rot in Abbildung 17) und kein *Alignment* wurde aufgrund von schlechter Qualität herausgefiltert (keine „*Low Alignment Quality*“, grau in Abbildung 17). Ein kleiner Anteil der *reads* wurde an nicht-codierenden Loci („*No Feature*“, orange in Abbildung 17, $\emptyset 1,81\% \pm 0,1\%$) oder uneindeutig aligniert („*Ambiguous*“, violett in Abbildung 17, $\emptyset 9,22\% \pm 0,19\%$, „*Alignment not unique*“, hellblau in Abbildung 17, $\emptyset 20,73\% \pm 1,63\%$).

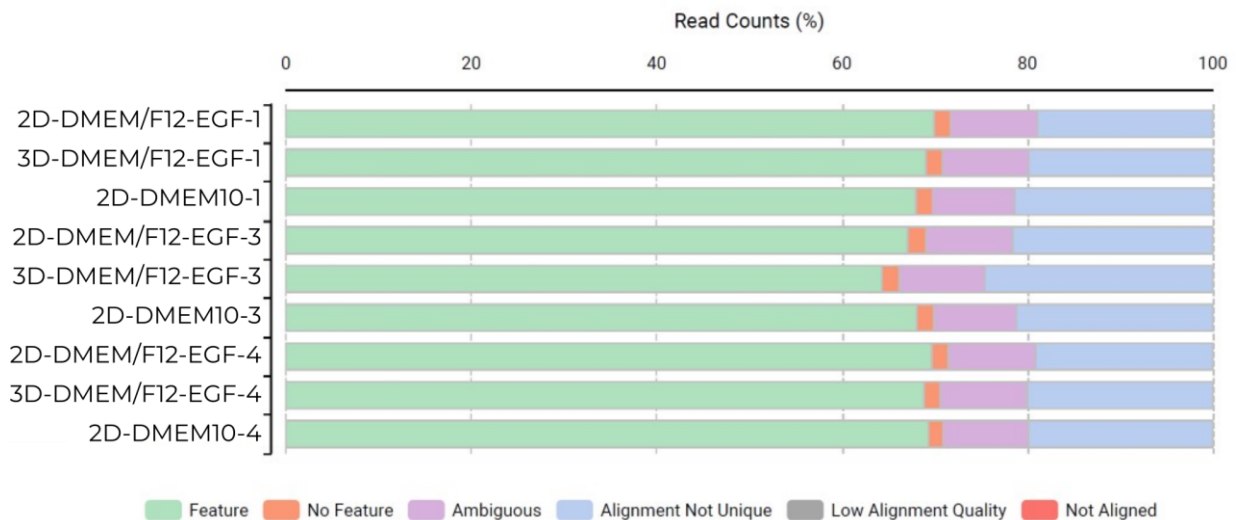


Abbildung 17: Die Mehrheit der *reads* waren assoziiert mit einem Gen. Durchschnittlich $68,25\% \pm 1,63\%$ *reads* an einem Gen. Probenabkürzung: Kulturform-Medium-Nummer der hPDSC-Linie. *Feature* (grün): Locus, dem eine Funktion zugeordnet werden konnte, hieraus ergaben sich *counts* und Bibliothek; *no feature* (orange): Locus, dem keine Funktion zugeordnet werden konnte; *ambiguous* (violett): zweideutig, *read* an zwei sich überschneidenden Genen *gemappt*; *Alignment not unique* (hellblau): *read* an mehr als einem Locus gemappt; *Low Alignment Quality* (grau): aufgrund geringer Qualität herausgefiltert; *Not Aligned* (rot): *reads* ohne *Alignment*. Erstellt mit OmicsBox auf Grundlage von HTSeq.

Der Anteil der Gen-assoziierten *reads* in hPDSC3-3D-DMEM/F12-EGF erschien geringer als der durchschnittliche Anteil der Gen-assoziierten *reads* in allen Proben. Die Bibliothek der Probe hPDSC3-3D-DMEM/F12-EGF war die größte (8.428.139 *reads*), weil die Zahl der insgesamt sequenzierten *reads* in dieser Probe am höchsten ist (13.106.068 *reads*). Die Abweichungen waren darauf zurückzuführen, dass die hPDSC3-Proben zuerst sequenziert wurden, also auf einer anderen Durchflusszelle als die anderen Proben, und waren zu vernachlässigen.

DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN KULTURKONDITIONEN DER hPDSCs

Der Fokus der differentiellen Genexpressionsanalyse (DEA) lag darauf herauszufinden, was die hPDSCs in dreidimensionaler Kultur von denen in adhärenter Kultur unterschied und, ob bereits das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF einen signifikanten Einfluss auf die Zellen hatte. Deswegen wurden die Konditionen paarweise mithilfe von edgeR verglichen:

1. 2D-DMEM10 *vs.* 2D-DMEM/F12-EGF = Standardkultur *vs.* adhärenzte Kultur in Differenzierungsmedium = **Medienvergleich**
2. 2D-DMEM/F12-EGF *vs.* 3D- DMEM/F12-EGF = adhärenzte Kultur in DMEM/F12-EGF *vs.* hPDSC-Sphäroide (in DMEM/F12-EGF) = **2D-3D-Vergleich**

Beide DEA zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen, also differenziell exprimierte Gene (DEG). Beim Medienvergleich waren 1619 Gene differenziell exprimiert; davon 1036 geringer exprimiert in DMEM/F12-EGF und 583 höher exprimiert in DMEM/F12-EGF (Abbildung 18).

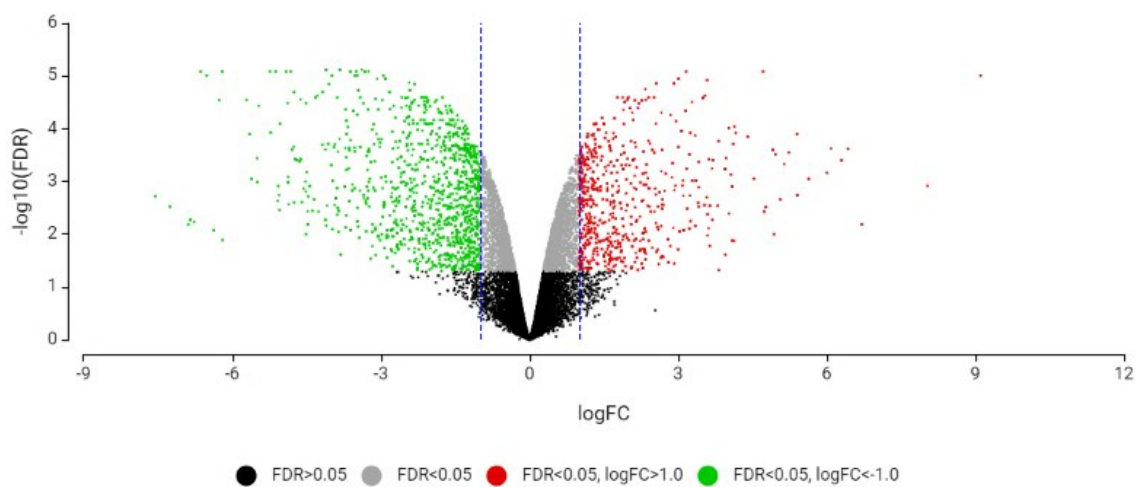


Abbildung 18: Die Genexpression von in DMEM10 und DMEM/F12-EGF adhärenzt kultivierten hPDSCs unterschied sich in 1619 Genen signifikant (1036, 583). Volcano-Plot der differentiellen Genexpressionsanalyse zwischen 2D-DMEM10 und 2D-DMEM/F12-EGF (Medienvergleich). FC: *fold change* (= x-fache Änderung); FDR: *false discovery rate* (= Falscherkennungsrate). Differenziell exprimierte Gene: 1619; rot: 583 in DMEM/F12-EGF höher exprimierte Gene; grün: 1036 in DMEM/F12-EGF niedriger exprimierte Gene; schwarz: herausgefiltert aufgrund hoher FDR; grau: herausgefiltert aufgrund geringen Unterschiedes zwischen Konditionen (geringer FC).

Beim 2D-3D-Vergleich waren 1439 Gene differenziell exprimiert; davon 630 niedriger exprimiert in hPDSC-Sphäroiden und 809 höher exprimiert in hPDSC-Sphäroiden (Abbildung 19).

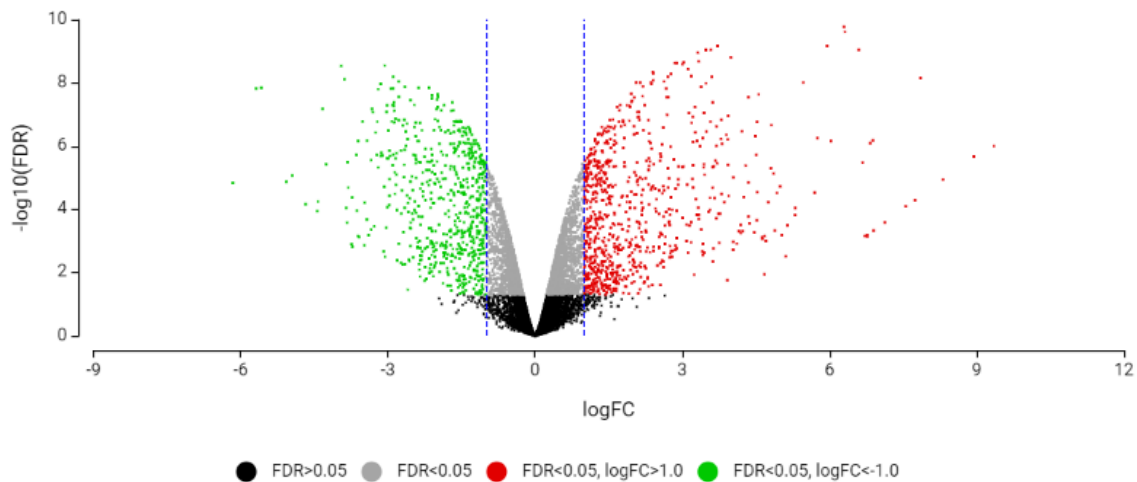


Abbildung 19: Die Genexpression von adhären und dreidimensional in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs unterschied sich in 1439 Genen signifikant (630, 809). *Volcano-Plot* der differentiellen Genexpressionsanalyse zwischen 2D-DMEM10 und 2D-DMEM/F12-EGF (2D-3D-Vergleich). FC: *fold change* (= x-fache Änderung); FDR: *false discovery rate* (= Falscherkennungsrate). Differenziell exprimierte Gene: 1439; rot: 809 in hPDSC-Sphäroiden höher exprimierte Gene; grün: 630 in hPDSC-Sphäroiden niedriger exprimierte Gene; schwarz: herausgefiltert aufgrund hoher FDR; grau: herausgefiltert aufgrund geringen Unterschiedes zwischen Konditionen (geringer FC).

Die *Volcano-Plots* zeigten eine typische Verteilung von DEG. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die Genexpressionsprofile der hPDSC in unterschiedlichen Kulturkonditionen sich nicht nur in einzelnen Genen signifikant unterschieden, sondern auch global. Diese globalen Unterschiede und die daraus resultierenden (Un-)Ähnlichkeiten der Proben wurden mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse der *counts* ermittelt.

STARKE PRÄGUNG DER GENEXPRESSION DER hPDSCs DURCH DIE KULTURKONDITIONEN

In einer Hauptkomponentenanalyse (HKA) mit den *counts* aller Proben zeigte sich, dass sich die Proben nach Kulturkonditionen *clusterten*, nicht nach Zelllinie (Abbildung 20). Die Datenpunkte der Proben, die auf dieselbe Art kultiviert wurden, hatten kleinere Abstände untereinander als die Proben aus demselben Patientenmaterial, sprich derselben Zelllinie. Besonders bei Betrachtung in der Dimension der Hauptkomponente 1 (engl. *principal component 1* = PC1), die 35 % der Variabilität der Proben abbildete, konnte man erkennen, dass die hPDSCs aus adhärenter Kultur in

DMEM10, kaum voneinander abwichen. Dasselbe galt für die hPDSCs in beiden DMEM/F12-EGF-Konditionen: die hPDSC1- und hPDSC4-Proben lagen besonders in der Dimension der PC1 nah beieinander. Nur bei den Datenpunkten der hPDSC3-Proben fiel wie bei der Verteilung der *reads* (vgl. Abbildung 17) eine Abweichung auf. Diese Abweichungen waren auf den früheren Sequenzierungslauf zurückzuführen und deshalb hier zu vernachlässigen. In der Dimension der PC2 zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei PC1. Die größten Distanzen zwischen den Datenpunkten der Proben derselben Kondition waren in der Dimension der dritten Hauptkomponente (PC3) zu verzeichnen.

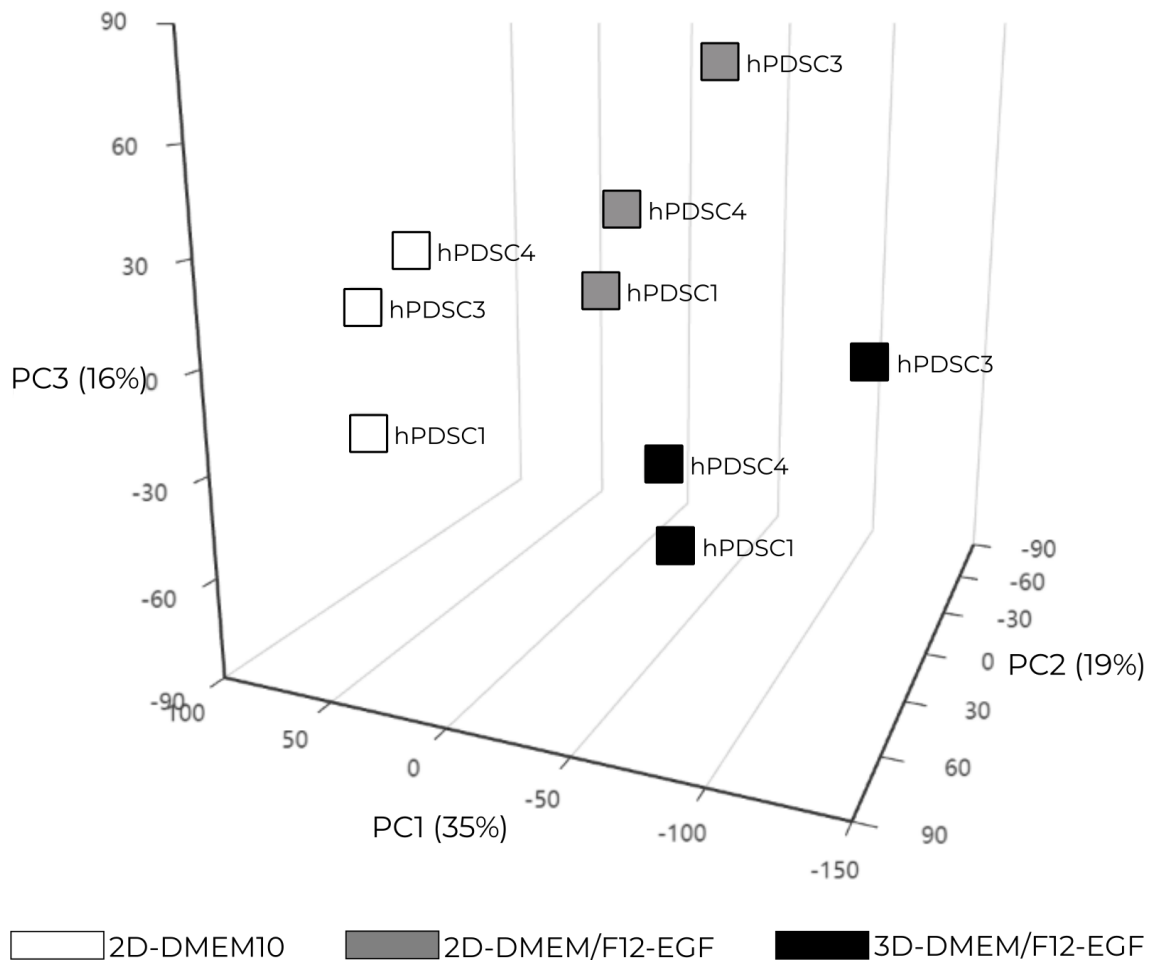


Abbildung 20: Die differenzielle Genexpression in hPDSCs durch Veränderung der Zellkulturbedingungen war reproduzierbar. Die Genexpression unterschiedlicher Zelllinien innerhalb einer Zellkulturkondition war ähnlicher als die derselben Zelllinie in einer anderen Zellkulturkondition. Hauptkomponentenanalyse zur Visualisierung der (Un-)Ähnlichkeit der Genexpression. Grundlage: *counts* aus RNA-Seq. Je größer die Abstände, desto stärker unterschied sich die Genexpression zwischen diesen beiden Proben. PC = engl. *principal component*, zu Deutsch Hauptkomponente; Prozentzahl: Anteil der Variabilität aller Proben, der durch diese PC abgebildet wurde.

Die drei Hauptkomponenten bildeten zwar nur 70% der Variabilität der Datenpunkte aller Proben ab (PC1 35 % + PC2 19 % + PC3 16 % = 70 %). Trotzdem war das Ergebnis der HKA nicht zu vernachlässigen, da insbesondere in Dimension der PC1, die den größten Anteil der Variabilität der Proben abbildete, die Proben aus denselben Kulturbedingungen *clusterten*.

Dasselbe Ergebnis der HKA auf Ebene der *counts* spiegelte sich in einem hierarchischem *Clustering* der Ergebnisse der DEA wider: die Top 50 differenziell exprimierten Gene *clusterten* die Proben ebenso nach den Zellkulturkonditionen. Jeweils 25 Gene, die mit der geringsten Fehlerwahrscheinlichkeit in einem der beiden Vergleiche differenziell exprimiert worden waren

(minimale FDR bei $FDR \leq 0.05$, $\logFC \geq 1$ oder $FDR \leq 0.05$, $\logFC \geq -1$), wurden in einer hierarchisch *geclusterten Heatmap* visualisiert (Abbildung 21).

Die hierarchische *Cluster*-Analyse beruht auf dem euklidischen Abstand zwischen den Genen (vertikales *Clustering*) und Proben (horizontales *Clustering*, siehe Dendrogramm) in Form ihrer skalierten Expressionsdaten (*z-scores*). Das *Clustering* der Proben (Abbildung 21, Dendrogramm) zeigte erneut, dass die hPDSCs mit denselben Kulturkonditionen sich in der Expression ähnlicher waren als die Proben aus derselben hPDSC-Linie. Außerdem machte es deutlich, dass die sechs Proben, die im gleichen Medium (DMEM/F12-EGF) kultiviert worden waren, sich in der Genexpression ähnlicher waren, als die Proben aus dem Standardmedium (DMEM10). Die erste Verzweigung des Dendrogramms trennte die Gesamtheit der Proben in zwei *Cluster*: Proben, die in DMEM/F12-EGF kultiviert worden waren und Proben die in DMEM10 kultiviert worden waren. Das *Cluster* der Proben aus DMEM/F12-EGF verzweigte sich dann in adhärent oder dreidimensional kultivierte hPDSCs, sodass dieselben *Cluster* wie in der HKA entstanden: ein *Cluster* pro Kulturkondition.

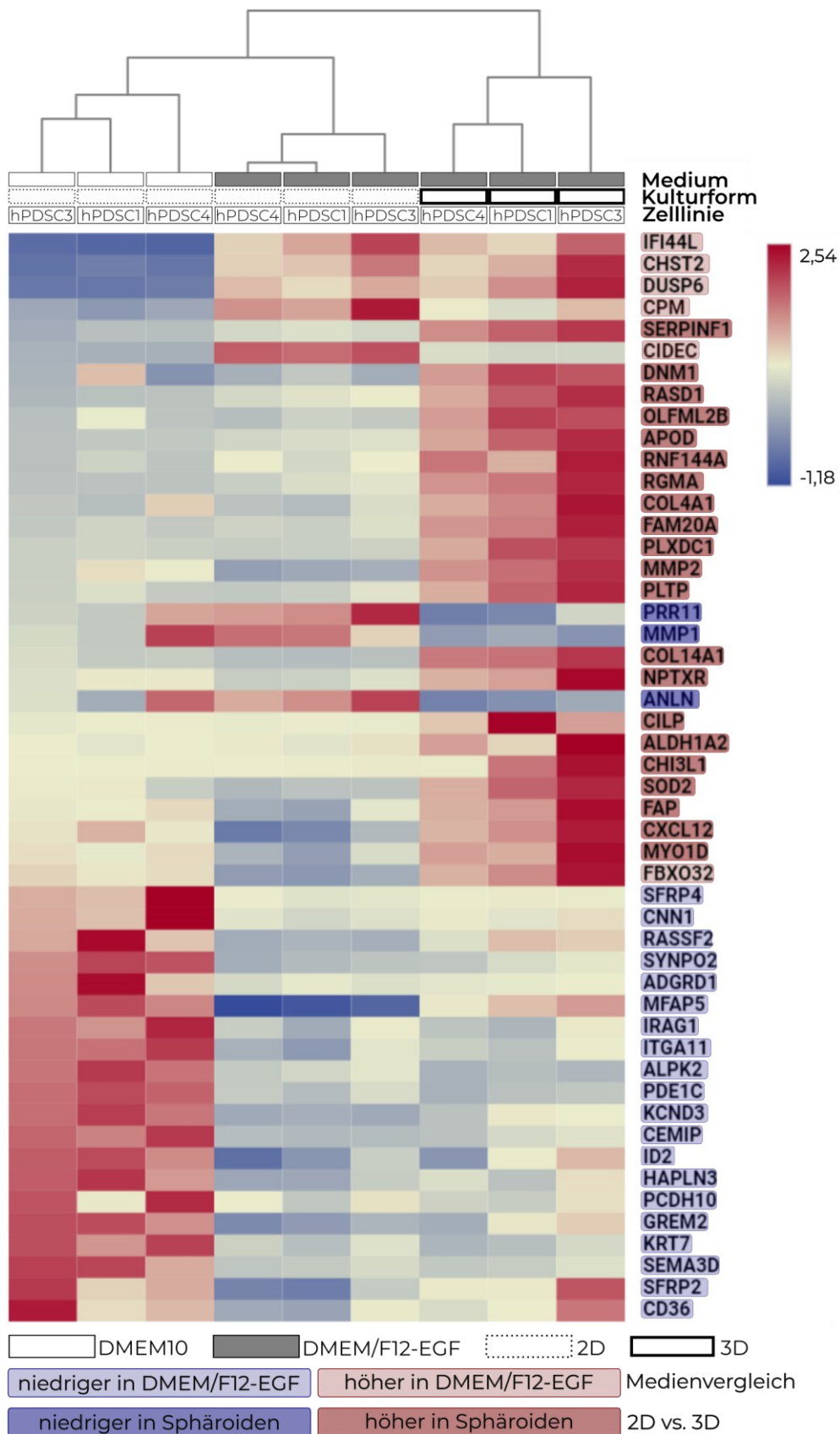


Abbildung 21: *Heatmap* der Top 50 differenziell exprimierten Gene nach minimalem FDR: Das *Clustering* der Proben zeigte, dass die Expression stärker durch die Kulturkonditionen als durch die Herkunft der hPDSCs geprägt wurden.

Fortsetzung Abbildung 21: Nach den beiden gepaarten DEA (2D-DMEM10 vs. 2D-DMEM/F12-EGF und 2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-EGF) wurden jeweils die 25 DEG (FDR ≤ 0.05 , $\log_{2}FC < -1$ und FDR ≤ 0.05 , $\log_{2}FC > 1$) mit dem geringsten FDR-Wert ausgewählt. Die hierarchische *Cluster*-Analyse beruht auf dem euklidischen Abstand zwischen den Genen (vertikales *Clustering*) und Proben (horizontales *Clustering*, siehe Dendrogramm) in Form ihrer skalierten Expressionsdaten ($z\text{-score} = (\text{Genexpression in einer Probe [counts]} - \text{durchschnittliche Genexpression über alle Proben [counts]}) / \text{Standardabweichung}$). Die Proben clusterten nach Konditionen. Die vertikalen Gen-Cluster könnten somit Konditions-spezifische Gene enthalten (z. B. SFRP4 bis CD36 für Standardkondition). Die farbigen Markierungen der Gen-Namen beziehen sich darauf, in welcher DEA dieses Gen unter den Top 25 war und die Expressionsabweichung von der Referenz.

Neben dieser Erkenntnis könnten die *Gen-Cluster*, die in einer der drei Konditionen besonders hoch exprimiert sind, Auskunft über mögliche neue Markergene geben: das oberste *Cluster* verbindet die beiden Konditionen (IFI44L bis CIDEA), die in DMEM/F12-EGF kultiviert wurden; darunter liegen zwei *Cluster* mit Genen, die besonders in der 3D-Kultur hoch exprimiert wurden (DNM1 bis PLTP und CILP bis FBXO32); und das unterste *Gen-Cluster* zeigt Gene, die besonders in den hPDSCs in Standardkultur, also humanen Parotis-abgeleiteten Stammzellen, stark exprimiert wurden (SFRP4 bis CD36). Zwei Gene, die aus der Literatur zu Speicheldrüsen bekannt sind, fielen auf: Das Gen für Keratin 7 (KRT7), einem Marker für Gangzellen, befindet sich in dem *Cluster* derjenigen Gene, die in beiden Differenzierungskonditionen niedriger exprimiert wurden als in hPDSCs in Standardkultur. Das Gen FAM20A (engl. *member A of family with sequence similarity 20*), ein Akteur in der verzweigenden Morphogenese, ist in einem *Cluster* mit Genen zu finden, die in hPDSC-Sphäroiden höher als in den adhärenen Kulturkonditionen exprimiert wurden.

ENRICHMENT VON EXTRAZELLULÄRMATRIX-BEZOGENEN PROZESSEN

Das *Enrichment*, also eine globale Analyse der durch die DEG beeinflussten Signalwege, wurde mithilfe der reactome-Datenbank und von reactome bereitgestellten Webtools durchgeführt.

Die durch DEG beeinflussten Signalwege wurden mittels Überrepräsentationsanalyse (engl. *over-representation analysis* = ORA) ermittelt und mit Reactome-Abbildungen dargestellt. Dabei wurden Listen der höher und niedriger exprimierten Gene getrennt voneinander analysiert. Dies

ermöglichte nachzuvollziehen, welche Signalwege verstärkt und welche weniger wahrscheinlich in den untersuchten hPDSCs abliefen.

Medienvergleich: *Enrichment* induzierte erhöhte Proliferation und Änderungen der EZM in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur, aber keine epitheliale Differenzierung

Die Ergebnisse der ORA im Medienvergleich bekräftigten die Beobachtung, dass die hPDSCs in adhärenter Kultur in DMEM/F12-EGF stärker proliferierten als in DMEM10. In adhärenz in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs waren einige Prozesse, die DNA-Replikation und Zellzyklus betreffen, durch höher exprimierte Gene *enriched* (Abbildung 22). Es handelt sich um Signalwege aus den übergeordneten Prozessen „*G1/S Transition*“, „*G2/M Checkpoints*“, „*Assembly of the pre-replicative complex*“ sowie „*Activation of the pre-replicative complex*“, „*DNA strand elongation*“ und „*Extension of Telomeres*“. Unter den durch niedriger exprimierte Gene *enriched* Signalwegen befanden sich hingegen keine die Zellproliferation betreffenden Signalwege. Dies war konform mit den Beobachtungen während der Zellkultur, dass die hPDSCs sich in adhärenz DMEM/F12-EGF-Kultur schneller teilten als in DMEM10.

Des Weiteren zeigte das *Enrichment* im Medienvergleich, dass die Signalweggruppe „*Cell-Cell communication*“ durch in DMEM/F12-EGF niedriger exprimierte Gene *enriched* war (Abbildung 22). Bei näherer Betrachtung stellte sich heraus, dass die differenzielle Expression des Cadherin 11-Gens (CDH11) all die Signalwege der Gruppe „*Cell-Cell communication*“ *enriched*: „*Regulation of CDH11 function*“, „*Regulation of CDH11 gene transcription*“ und „*Regulation of CDH11 mRNA translation by microRNAs*“.

Es waren weder epitheliale, noch speicheldrüsenspezifische Signalwege unter den durch die in DMEM/F12-EGF höher exprimierten DEG *enriched* Signalwegen zu finden. Auch aus der Gesamtheit der *enriched* Prozesse in adhärenz in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs ging weder eine deutlich epitheliale Differenzierung, noch eine Entwicklung zu sezernierenden Speicheldrüsenzellen hervor.

2D-DMEM10 vs. 2D-DMEM/F12-EGF

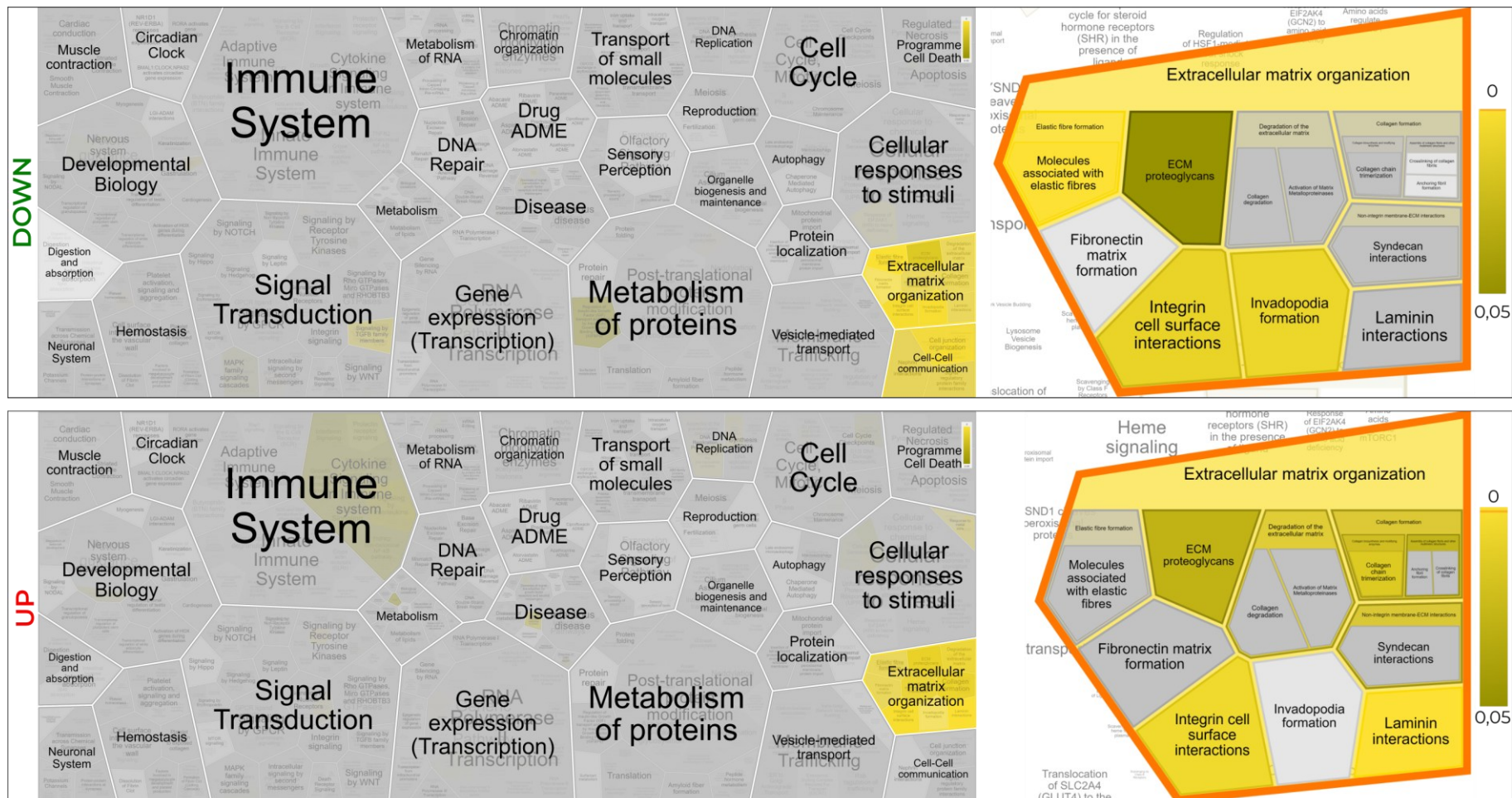


Abbildung 22: Reacfoam-Visualisierung der ORA des Medienvergleichs: Die DEG beeinflussten EZM-Organisationsprozesse.

Fortsetzung Abbildung 22: *Input:* Listen der niedriger bzw. höher exprimierten Gene aus dem Medienvergleich (2D-DMEM10 vs. 2D-DMEM/F12-EGF). Links: Überblick über alle in der reactome-Datenbank befindlichen Signalwege, schwarze Schrift: übergeordneter Gruppenname. Skalen und gelbe bis ockerfarbene Markierungen: nach p-Wert aus Überrepräsentationsanalyse mit Benjamini-Hochberg, $n = 3$. *DOWN:* durch in DMEM/F12-EGF niedriger exprimierte Gene beeinflusste Signalweggruppen: „*Extracellular matrix organization*“, „*Cell-Cell communication*“; *UP:* durch in DMEM/F12-EGF höher exprimierte Gene beeinflusste Signalweggruppe: „*Extracellular matrix organization*“; (nur Nennung und fortführend diskutiert, wenn Signalweggruppe höchster Ordnung signifikant *enrich* (gelb). Rechts: Vergrößerung der Signalweggruppe „*Extracellular matrix organization*“, v. r. n. l.: „*Elastic fibre formation: Molecules associated with elastic fibres*“; „*ECM proteoglycans*“; „*Degradation of the extracellular matrix: Collagen degradation, Activation of Matrix Metalloproteinases*“; „*Collagen formation: [Collagen biosynthesis and modifying enzymes: Collagen chain trimerization], [Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures: Anchoring fibril formation, Crosslinking of collagen fibrils]*“; „*Non-integrin membrane ECM interactions: Syndecan interactions*“.

2D-3D-Vergleich: *Enrichment* induzierte niedrigere Proliferation und Änderungen der EZM in Sphäroiden

Gene, die den Zellzyklus, die DNA-Replikation und die DNA-Reparatur betreffen, waren in hPDSC-Sphäroiden niedriger exprimiert als in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur der hPDSCs (Abbildung 23). Dies bekräftigte die Ergebnisse der qRT-PCR mit Primern für Ki67: Der Proliferationsmarker Ki67 wurde in hPDSC-Sphäroiden tendenziell geringer exprimiert als in Standardkultur und adhärent in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs (vgl. Abbildung 14).

Was aber in beiden DEA besonders auffiel, war, dass EZM-assoziierte Prozesse *enrich* waren; sowohl durch höher als auch niedriger exprimierte DEG (Abbildung 22 und Abbildung 23).

Viele der Signalweggruppen, die durch höher exprimierte DEG im Medienvergleich *enrich* wurden, sind im 2D-3D-Vergleich ebenfalls durch in den Sphäroiden höher exprimierte DEG *enrich*: Sowohl das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF als auch die 3D-Kultur haben dazu geführt, dass die Transkription der Gene in folgenden Signalweggruppen stieg: „*ECM proteoglycans*“, „*Degradation of the extracellular matrix*“, „*Collagen formation*“, „*Non-integrin membrane ECM-interactions*“, „*Integrin cell surface interactions*“ und „*Laminin interactions*“.

Das *Enrichment* anderer Signalweggruppen wurde im 2D-3D-Vergleich durch DEG herbeigeführt, die im Medienvergleich in die entgegengesetzte Richtung differenziell exprimiert waren: Die Prozesse „*Elastic fibre formation*“ und „*Invadopodia formation*“ wurden im Vergleich der adhärenten Kulturen durch niedriger exprimierte DEG in DMEM/F12-EGF *enrich*; im 2D-3D-Vergleich wiederum wurden diese durch in Sphäroiden höher exprimierte DEG *enrich*. „*Integrin cell surface interactions*“ wurde durch sowohl höher als auch niedriger exprimierte DEG im Medienvergleich

enriched. Im 2D-3D-Vergleich in Sphäroiden wurde diese Signalweggruppe nur durch höher exprimierte Gene beeinflusst.

hPDSC-Sphäroide exprimierten viele Gene von EZM-Molekülen der Speicheldrüse

Die große Summe der *enriched* Prozesse zur EZM-Organisation verdeutlichte das Potenzial der hPDSC-Sphäroide, eigens eine gewebensähnliche Umgebung zu erschaffen. Um zu evaluieren, ob die hPDSC-Sphäroide in DMEM/F12-EGF-Kultur sich sogar zu einem Speicheldrüsenmodell entwickeln könnten, wurden die DEG, die zum Enrichment von Prozessen der EZM-Organisation führten, mit einer Liste von Genen abgeglichen, die aus murinen adulten SMG isoliert wurden (vgl. Tabelle A. 2 (O. N. Tran et al., 2022)). Diese EZM-Bestandteile zeigten außerdem differenzierungsfördernde Eigenschaften bei der Entwicklung eines Speicheldrüsenmodells aus MSCs. Einige Gene von EZM-Molekülen, die die verzweigende Morphogenese beeinflussen, sind nicht in der Liste der von Tran und Kollegium identifizierten SMG-EZM-Bestandteile aufgeführt. Diese Gene wurden ergänzt und in Abbildung 24 sortiert nach den Expressionsänderungen, die in den DEA aufgedeckt wurden. Das Kreisdiagramm verdeutlicht, dass der Großteil der untersuchten Speicheldrüsen-EZM-assoziierten Gene in den hPDSCs exprimiert werden.

2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-EGF

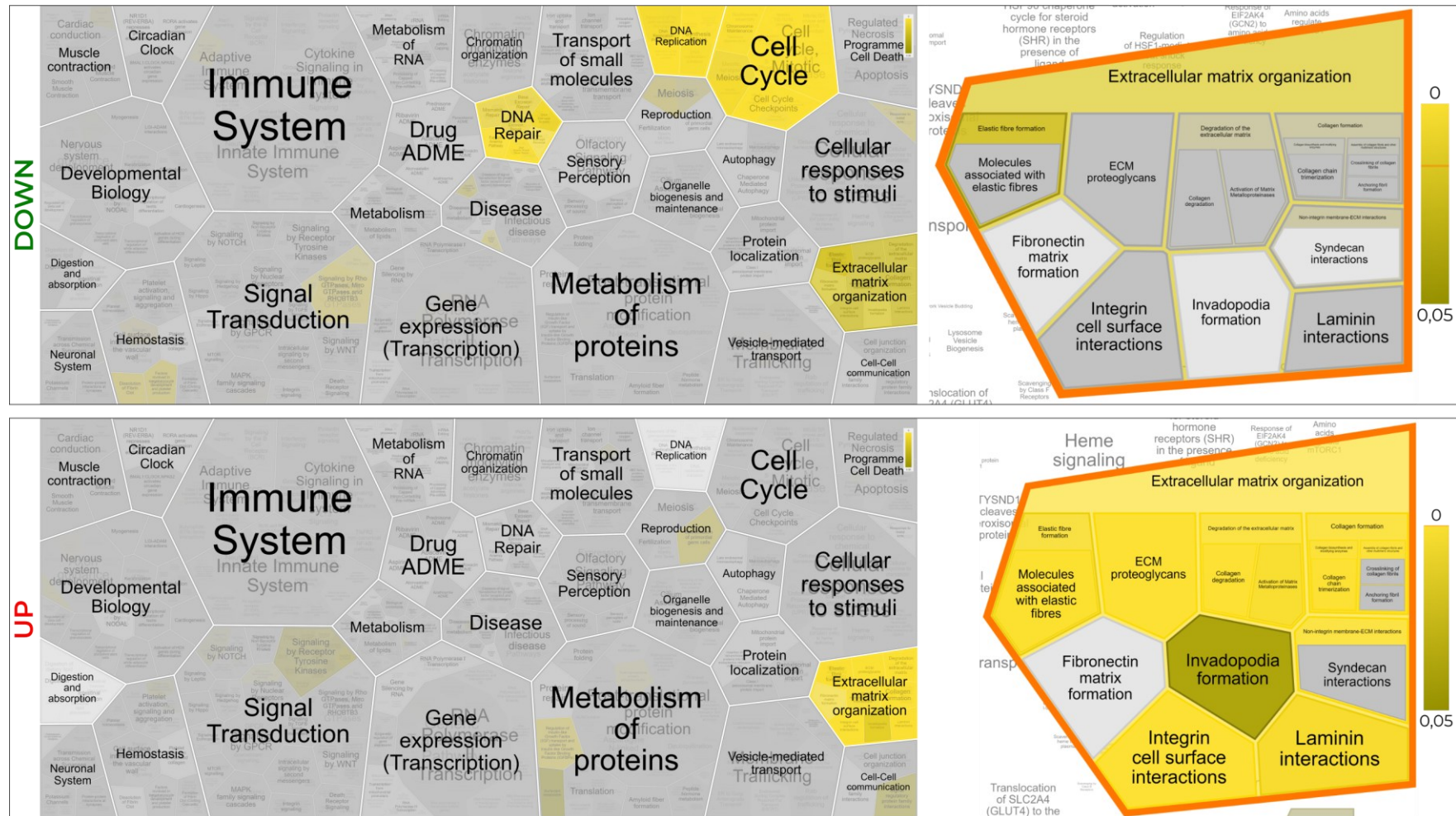


Abbildung 23: Reacfoam-Visualisierung der ORA des 2D-3D-Vergleichs: Die DEG beeinflussten EZM-Organisationsprozesse; niedrigere Genexpression in hPDS-C-Sphäroiden beeinflusste Proliferations-assoziierte Prozesse.

Fortsetzung Abbildung 23: *Input:* Listen der niedriger bzw. höher exprimierten Gene aus dem 2D-3D-Vergleich (2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-EGF). Links: Überblick über alle in der reactome-Datenbank befindlichen Signalwege, schwarze Schrift: übergeordneter Gruppenname. Skalen und gelbe bis ockerfarbene Markierungen: nach p-Wert aus Überrepräsentationsanalyse mit Benjamini-Hochberg, $n = 3$. *DOWN:* durch niedriger exprimierte Gene beeinflusste Signalweggruppen: „DNA Replication“, „Cell Cycle“, DNA Repair“, „Extracellular matrix organization“; *UP:* durch höher exprimierte Gene beeinflusste Signalweggruppe: „Extracellular matrix organization“; nur Nennung und fortführend diskutiert, wenn Signalweggruppe höchster Ordnung signifikant *enrich*t (gelb). Rechts: Vergrößerung der Signalweggruppe „Extracellular matrix organization“, v. l. n. r.: „Elastic fibre formation: Molecules associated with elastic fibres“; „ECM proteoglycans“; „Degradation of the extracellular matrix: Collagen degradation, Activation of Matrix Metalloproteinases“; „Collagen formation: [Collagen biosynthesis and modifying enzymes: Collagen chain trimerization], [Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures: Anchoring fibril formation, Crosslinking of collagen fibrils]“; „Non-integrin membrane ECM interactions: Syndecan interactions“.

Das Gen von Connexin 43, GJA1 (engl. *gap junction protein 1*), wird in adhärenter DMEM/F12-Kultur höher exprimiert als in Standardkultur der hPDSCs und in hPDSC-Sphäroiden abermals höher als in adhären in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs (Abbildung 24, grün-dunkelgrün kariert). HPSG2, das Gen von Perlecan, wurde in allen Konditionen der hPDSCs stark exprimiert, aber in hPDSCs in den DMEM/F12-EGF-Kulturen geringer als in hPDSCs in Standardkultur (Abbildung 24, rot). Laminin $\alpha 1$ ist eine Untereinheit in verlinkenden Lamininen in der EZM der sich entwickelnden Speicheldrüse. Das zugehörige Gen LAMA1 wurde in beiden Vergleichen erhöht exprimiert; also in hPDSCs in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur höher als in Standardkultur und in hPDSC-Sphäroiden abermals höher als in adhären in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs (siehe Abbildung 24, grün-dunkelgrün kariert). FN1, das Gen des für die Spaltenbildung essenziellen EZM-Moleküls Fibronectin, wurde im 2D-3D-Vergleich nicht differenziell exprimiert, es wurde in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur gegenüber Standardkultur jedoch erhöht (siehe Abbildung 24, grün).

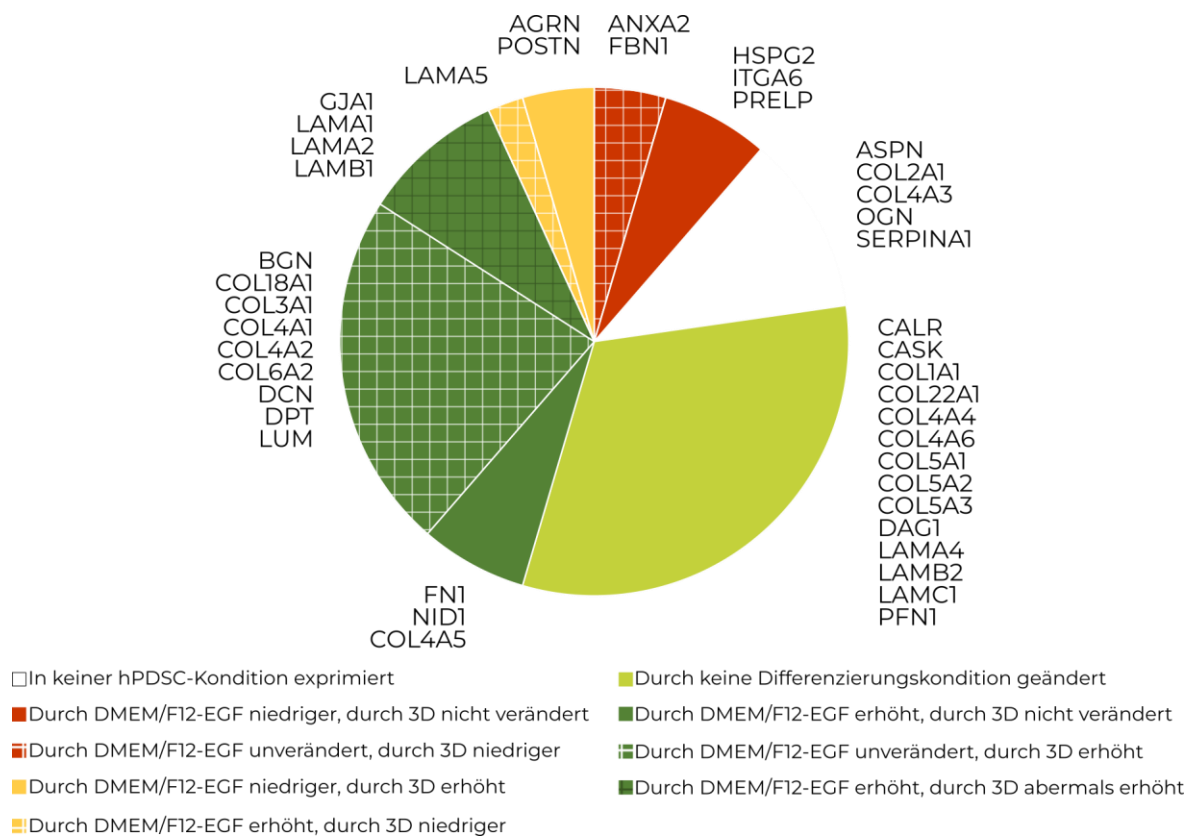


Abbildung 24: Der Großteil der untersuchten EZM-Gene wurde in hPDSCs in den Differenzierungs-konditionen auf demselben Level oder höher als in hPDSCs in Standardkultur exprimiert. Gene sortiert in Gruppen nach ihren Genexpressionsänderungen anhand beider DEA. Alle Grüntöne: Gene, die in hPDSCs unverändert oder erhöht exprimiert wurden; gelb: Gene, die durch die Differenzierungs-konditionen unterschiedlich beeinflusst wurden; rot: Gene, die durch die Differenzierungs-konditionen niedriger exprimiert wurden; leer (weiß): Gene, die in keiner hPDSC-Kultur exprimiert wurden; kariert: durch 3D-Kultur beeinflusst, Ausnahme: Gene des gelben Abschnitts wurden auch ohne kariertes Muster durch 3D-Kultur beeinflusst. Bedeutungen der Gennamen sind dem Glossar zu entnehmen.

Von den 40 durch Tran et al. gefundenen EZM-Genen der Speicheldrüse wurden nur fünf in den hPDSC-Sphäroiden nicht exprimiert (Tabelle A. 2). Die nicht exprimierten Gene codieren für zwei Kollagenuntereinheiten (COL2A1 und COL4A3), Asporin (ASPN), Osteoglyzin (OGN) und *Serpin Family A Member 1* (SERPINA1).

Detektierbar in hPDSC-Sphäroiden exprimiert, aber niedriger exprimiert als in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur, waren die Gene von Annexin A2 (ANXA2), Fibrillin 1 (FBN1) und Laminin-Untereinheit $\alpha 5$ (LAMA5). Die Genexpression von LAMA5 zeigte sich im Medienvergleich jedoch höher in der DMEM/F12-Kultur. Deshalb ließ sich nicht feststellen, wie die

LAMA5-Expression in hPDSC-Sphäroiden im Vergleich zu hPDSCs in Standardkultur ist (siehe Abbildung 24, gelb-weiß kariert).

In gleichen Maßen in adhärenter sowie dreidimensionaler DMEM/F12-EGF-Kultur exprimiert wurden die Gene vieler Kollagen- und Laminin-Untereinheiten, ebenso wie Calreticulin (CALR), Calcium/Calmodulin abhängige Serin-Proteinkinase (CASK), Dystroglykan (DAG1), Integrin $\alpha 6$ (ITGA6), Nidogen 1 (NID1), Profilin 1 (PFN1) und Prolargin (PRELP; siehe Abbildung 24, hellgrün). Der Expressionsunterschied im Medienvergleich könnte dabei Aufschluss darüber geben, ob die Expression in hPDSC-Sphäroiden trotzdem höher ist als in den hPDSCs aus Standardkultur in DMEM10:

COL4A5 und NID1 wurden in hPDSCs in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur höher exprimiert als in Standardkultur. Das Expressionslevel dieser Gene in hPDSC-Sphäroiden war ähnlich wie in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur; also war es voraussichtlich höher als in Standardkultur (siehe Abbildung 24, grün).

Unter den in hPDSC-Sphäroiden erhöht exprimierten Genen befanden sich Gene vieler Kollagen- und Laminin-Untereinheiten, ebenso wie Gene einiger Proteoglykane:

Biglykan (BGN), COL18A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL6A2, Decorin (DCN), Dermatopontin (DPT) und Lumican (LUM) wurden in hPDSC-Sphäroiden höher exprimiert als in adhärenter in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs. Im Medienvergleich konnte bei diesen Genen kein Expressionsunterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 24, grün-weiß kariert). Die Expression der Gene LAMA2 und LAMB1 war in adhärenter in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs höher als in Standardkultur und zeigte sich in hPDSC-Sphäroiden abermals höher als in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur (siehe Abbildung 24, grün-dunkelgrün kariert).

Agrin (AGRN) und Periostin (POSTN) wurden in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur geringer exprimiert als in Standardkultur der hPDSCs. Ihre Genexpression war in hPDSC-Sphäroiden jedoch höher als in adhärenter in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs. Es ließ sich keine eindeutige Aussage über ihr Expressionslevel in Sphäroiden im Vergleich zur Standardkultur treffen (siehe Abbildung 24, gelb).

Filamentöse Kollagen IV-Färbung in hPDSC-Sphäroiden

Kollagen IV ist Hauptbestandteil der Basalmembran, die die Azini der Parotis umgibt. Die Gene von fünf der sechs Kollagen IV-Untereinheiten wurden in hPDSC-Sphäroiden exprimiert: COL4A1, COL4A2, COL4A4, COL4A5 und COL4A6, drei davon in hPDSC-Sphäroiden höher als in adhärenter Kultur. Um die Translation und Lokalisation von Kollagen IV in den hPDSCs zu prüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt (Abbildung 25).

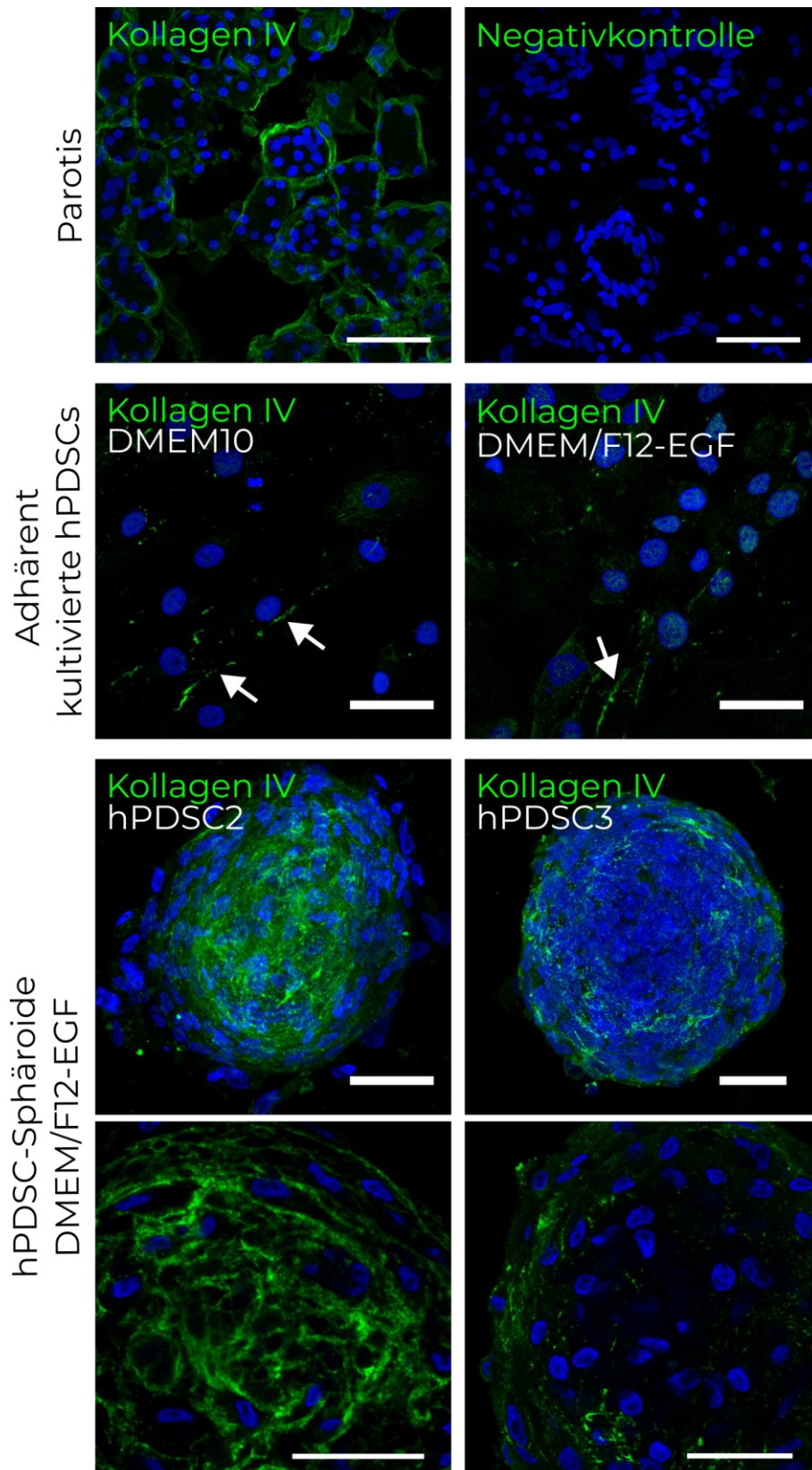


Abbildung 25: hPDSC wiesen in allen Konditionen eine filamentöse Kollagen IV-Färbung auf, in hPDSC-Sphäroiden ist diese aber nicht eindeutig lokalisiert. Parotisschnitte (kryokonserviert, 12 μ m), adhärenz in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierte hPDSCs sowie hPDSC-Sphäroide aus DMEM/F12-EGF-Kultur.

Fortsetzung Abbildung 25: wurden mit polyklonalen Primärantikörpern für Kollagen IV (aus Kaninchen) und FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern (aus Ziege gegen Kaninchen) gefärbt (grün). Die Negativkontrolle bestand in einer Färbung ohne den Primärantikörper. In der Parotis liegt Kollagen IV vorwiegend in der Basalmembran (Parotisschnitte; obere Reihe). Die Negativkontrolle zeigte keine auffälligen Artefakte oder Rauschen. In den adhärent wachsenden Zellen in beiden Medien (mittlere Reihen) sind nur wenige Zellen Kollagen IV-positiv und die Färbung der filamentösen Strukturen schien teilweise unterbrochen zu sein. In den hPDSC-Sphäroiden (untere Reihen, orthogonale Projektionen der Z-Stapel) fanden sich mehr Kollagen IV-positiv Zellen als in adhärent wachsenden hPDSCs. In manchen hPDSC-Sphäroiden (z. B. hier hPDSC2) waren die Kollagen IV-Filamente vorwiegend im Innern des Sphäroids lokalisiert; in anderen befanden sich die Kollagen IV-positiven Zellen in der äußeren Schicht des hPDSC-Sphäroids (hier z. B. hPDSC3). Maßstabsbalken 50 μm .

Die Kontrollfärbung von Parotis zeigte die natürliche Lokalisation des Kollagen IV in der Basalmembran um die Azini und Gänge. Alle Färbungen der Parotis sowie der hPDSCs wiesen die typischen filamentösen Strukturen von Kollagen IV auf. Auch kleine Subpopulationen der adhärent wachsenden hPDSCs in DMEM10 sowie DMEM/F12-EGF waren Kollagen IV-positiv. Wie bereits durch die RNA-Seq-Daten zu erwarten war, erschien der Anteil der Kollagen IV-positiven Zellen in manchen hPDSC-Sphäroiden größer (Abbildung 25, untere Hälfte). Die Lokalisation in den Sphäroiden war jedoch nicht eindeutig begrenzt: in einigen Sphäroiden zogen sich die filamentösen Kollagen IV-Strukturen durch das gesamte Sphäroid (Abbildung 25, untere Hälfte links), in anderen Sphäroiden beschränkte sich die Kollagen IV-Färbung auf die äußeren Zellschichten (Abbildung 25, untere Hälfte rechts). Außerdem erschien die Färbung in den Sphäroiden brüchiger als auf dem Parotisgewebe.

4 Diskussion

4.1 Die adhärente hPDSC-Kultur in epithelialen Differenzierungsmedien – ein potenzielles Speicheldrüsenmodell?

Um herauszufinden, welches Differenzierungsmedium zur Unterstützung der Speicheldrüsen-differenzierung der hPDSCs am besten geeignet ist, wurden diese zunächst adhärent in den zwei epithelialen Differenzierungsmedien KSFM und DMEM/F12-EGF kultiviert. Die hPDSCs änderten in beiden Medien ihre Morphologie und ihr Wachstumsverhalten: in KSFM zogen die Zellen sich scheinbar zusammen und proliferierten kaum noch; in DMEM/F12-EGF ließ sich das Gegenteil beobachten: die hPDSCs erschienen flacher, erreichten schneller eine Konfluenz und exprimierten den Zellzyklus betreffende Gene stärker als die hPDSC-Sphäroide. In allen drei Medien exprimierten die adhärent kultivierten hPDSCs mRNA des Stammzellmarkers Nestin und in geringen Maßen mRNA azinärer Marker.

OPTIMIERUNG DER hPDSC-KULTUR IN SERUMFREIEN MEDIUM ERFORDERLICH

Die hPDSCs in KSFM-Kultur zeigten keine ersichtliche Proliferation und wurden nach Medienumstellung nicht mehr konfluent, obwohl KSFM mit dem mitogenen Wachstumsfaktor EGF und bovinem Hypophysenextrakt (engl. *bovine pituitary extract* = BPE) supplementiert war. Trotz fehlender Proliferation könnte KSFM ein geeignetes Medium für Differenzierungsexperimente der hPDSCs sein. Die Zellen in adhärenter KSFM-Kultur exprimierten azinäre Marker wie α -Amylase 1, CHRM3, TMEM16A und Aquaporin 5, während die hPDSCs aus DMEM/F12-Kultur kein AQP5 exprimierten (vgl. Abbildung 8). hPDSCs in KSFM-Kultur exprimierten auch den Stammzellmarker Nestin, der eigentlich mit proliferierenden Zellen in Verbindung gebracht wird (Wiese et al., 2004). Die Expression von Nestin scheint keinen direkten Zusammenhang mit der Proliferationsfähigkeit zu haben. Da Proliferation keine essenzielle Voraussetzung für ein ausdifferenziertes zelluläres Testsystem ist, wurde das Medium nicht ausselektiert. Außerdem haben

sich serumfreie Medien für dreidimensionale zelluläre Speicheldrüsenmodelle bewährt (Joraku et al., 2005; Shin, Hong, et al., 2018; Sui et al., 2020). Die Umstellung der Standardkultur auf serumfreie Kultur mit KSFM erfolgte höchstwahrscheinlich zu abrupt. Passagierete hPDSCs wurden unverzüglich in 100 % KSFM resuspendiert und kultiviert, statt das Medium wie vom Hersteller empfohlen zunächst anteilig auszutauschen. Eine andere Möglichkeit wäre, die Medien DMEM/F12-EGF und KSFM durch eine zeitliche Abfolge miteinander zu kombinieren, um eine epitheliale Differenzierung zu erhalten und die Zellen an eine Serumreduktion zu gewöhnen. Dieses Protokoll wurde anhand von primären Schweißdrüsenzellen etabliert (Ertongur-Fauth, 2017; Gao et al., 2014; Hilger, 2021). Der Versuch, das Protokoll auf Speicheldrüsen zu übertragen, erzeugte zunächst vielversprechende Zellkulturen (siehe Anhang (Hilger, 2021)). Leider proliferierte die primäre Zellkultur weder über mehr als vier Passagen, noch ließ sie sich in einem Labor zur Immortalisierung reproduzierbar etablieren. Die Medien aus dem Protokoll zur Isolation epithelialer Schweißdrüsenzellen fanden folglich Anwendung in der Differenzierungskultur der hPDSCs.

VERSTÄRKTE PROLIFERATION ABER KEINE EINDEUTIGE SPEICHELDRÜSENDIFFERENZIERUNG DURCH DMEM/F12-EGF

Die adhärente hPDSC-Kultur in DMEM/F12-EGF wuchs schneller konfluent als in DMEM10 und veränderte sich geringfügig morphologisch. Die hPDSCs in niedrigen Passagen exprimierten wie in Standardkultur und in KSFM die in der qRT-PCR untersuchten azinären Marker α -Amylase 1, CHRM3 und TMEM16A, jedoch kein Aquaporin 5 (siehe Abbildung 8). Die Immunfluoreszenzfärbungen der hPDSCs wiesen jedoch keinen der azinären Marker auf (siehe Anhang). Dies könnte an fehlender Translation und Translokalisierung der Proteine liegen.

Die Expression des Stammzellmarkers Nestin wurde in den hPDSCs in DMEM/F12-EGF-Kultur signifikant erhöht, was gegen eine differenzierende Wirkung des Mediums sprach (siehe Abbildung 8). Viele Ergebnisse und Beobachtungen verdeutlichten das starke Proliferationspotenzial der hPDSCs, die in DMEM/F12-EGF kultiviert wurden. Die adhärente Kultur in DMEM/F12-EGF wurde am schnellsten konfluent (siehe Abbildung 7). Die Genexpression des Proliferationsmarkers Ki67 war in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur tendenziell am höchsten (siehe Abbildung 14). In hPDSC-Sphäroiden waren Zellzyklus-assoziierte Gene geringer exprimiert als in adhärenter

DMEM/F12-EGF-Kultur (siehe Abbildung 23). Aber auch bei hPDSC-Sphäroiden in DMEM/F12-EGF deutete sich ein größeres Proliferationspotenzial als in DMEM10 an (siehe Abbildung 10). Worauf ist die starke Proliferation der hPDSCs in dem Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF zurückzuführen?

Triiodothyronin (T3) ist ein Schilddrüsenhormon, das auch in FKS vorkommt. Es wird Zellkulturmedien gewöhnlicherweise zugesetzt, um Zelldifferenzierung zu regulieren und die Proteinsynthese zu erhöhen. T3 hat sowohl das Potenzial Stammzellkulturen zu stabilisieren als auch definierte Differenzierung zu unterstützen (Deng et al., 2022). Möglicherweise hatte es auf hPDSCs in DMEM/F12-EGF-Kultur diesen stabilisierenden Einfluss und erhöhte die Überlebensrate nach der Passagierung. Dies, ebenso wie eine erhöhte Proteinsynthese, könnte die frühere Konfluenz im Vergleich zur Standardkultur erklären. Möglicherweise ist auch die erhöhte Nestin-Expression auf die Stabilisierung des Stammzellzustands der hPDSCs zurückzuführen. Wiese und Kollegium beschreiben eine steigende Nestin-Expression in Zusammenhang mit der beginnenden Differenzierung von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESC) zu multipotenten Vorläuferzellen (Wiese et al., 2004). Womöglich läuft ein ähnlicher Prozess auch bei der beginnenden Differenzierung der hPDSCs durch Kultur in DMEM/F12-EGF ab. Die Änderung der Zellmorphologie in DMEM/F12-EGF-Kultur könnte durch Hydrocortison geprägt sein, für das ein solcher Effekt beschrieben ist (Wu & Sato, 1978). In serumfreier HeLa-Zellkultur hat Hydrocortison Einfluss auf die Zelloberfläche und somit auch die Zellmorphologie. Insulin-Transferrin-Selen (ITS), Hydrocortison und EGF sind klassische mitogene Supplemente, die in serumreduzierter oder serumfreier Zellkultur eingesetzt werden. Insulin begünstigt die Glukose- und Aminosäureaufnahme von Zellen (Hay & Paul, 1967). Außerdem hat ITS eine antioxidative Wirkung, da Transferrin reaktive Eisenionen und Selen freie Sauerstoffradikale bindet (Freshney, 1990). Transferrin war essenziell in der Kultur explantierter embryonaler muriner submandibulären Speicheldrüse (engl. *submandibulary gland* = SMG). In serumfreier Kultur ohne Transferrin wurden signifikant weniger Verzweigungen in der Morphogenese beobachtet (Kadoya et al., 1995). Dies spricht für einen positiven Effekt von Transferrin auf die Differenzierung von hPDSCs und könnte in der Sphäroidkultur zur Strukturierung durch Spaltenbildung beitragen. Dasselbe gilt für den epithelialen Wachstumsfaktor (EGF), der ein potenter mitogener Faktor als auch ein unterstützender Faktor in der verzweigenden Morphogenese ist (Kadoya et al., 1997). All diese

Mediumkomponenten könnten die starke Proliferation der hPDSCs in Kultur mit DMEM/F12-EGF erklären. Die starke Proliferation könnte von Vorteil sein, um viele Zellen zu generieren, die in Hochdurchsatz-verfahren in industriellen Experimenten zur Entdeckung neuer Wirkstoffe verhelfen könnten.

Jedoch exprimierten hPDSCs in höheren Passagen, die für den direkten Vergleich zwischen adhärenter und dreidimensionaler Kultur eingesetzt wurden, in den adhärennten Konditionen kein AQP5 oder CHRM3 (siehe Abbildung 15). Weder die in DMEM10 kultivierten noch die in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs wiesen in hohen Passagen messbare CHRM3-Expression auf. Das bestätigte die Erkenntnisse, dass primäre Zellen im Verlauf der Kultur auf Plastik dedifferenzieren (Rapoport et al., 2009; Szlávik et al., 2008; B.-X. Zhang et al., 2015).

Auch die Gesamttranskriptomanalyse der adhärent in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs offenbarte keine eindeutige Differenzierung zu epithelialen Speicheldrüsenzellen. Weder befanden sich viele Speicheldrüsenmarkergene unter den Top 25 differenziell exprimierten Genen (DEG) des Medienvergleichs (siehe Abbildung 21), noch sprach das *Enrichment* für vermehrt ablaufende Speicheldrüsenprozesse in den adhärent in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs (siehe Abbildung 22).

Ein Speicheldrüsenmarkergen, das unter den Top 25 DEG des Medienvergleichs auffiel und in hPDSCs in DMEM/F12-EGF niedriger exprimiert wurde, war KRT7. Das zugehörige Protein Keratin 7 ist in Speicheldrüsen ein Marker für Gangzellen (Born et al., 1987). Die niedrigere Expression in den hPDSCs in den Differenzierungskonditionen könnte bedeuten, dass die Zellen sich zu azinären Zellen entwickeln; sicher spricht die verringerte KRT7-Expression gegen die Entwicklung zu Gangzellen durch DMEM/F12-EGF.

Das *Enrichment* legte nahe, dass die EZM und die Zell-Zell-Verbindungen der in DMEM/F12-EGF kultivierten Zellen sich veränderten. Die Untersuchung ausgewählter EZM-Gene, die in muriner SMG identifiziert wurden und differenzierungsfördernd wirkten, sowie weiterer an der Speicheldrüsenmorphogenese beteiligter EZM-Gene ergab, dass Dreiviertel davon in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur exprimiert wurden; ein Fünftel sogar höher als in Standardkultur (siehe Abbildung 24). Dies könnte auf eine Differenzierung zu Speicheldrüsenzellen durch DMEM/F12-EGF hinweisen.

Im *Enrichment* des Medienvergleichs fiel die Signalweggruppe „*Cell-Cell-Communication*“ durch niedriger exprimierte Gene auf. Ein Blick in die Genliste der betroffenen Signalwege zeigte, dass dieses *Enrichment* auf die niedrige Expression des Gens von Cadherin 11 (CDH11) in adhärenz in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs zurückzuführen ist. Cadherin 11 spielt eine Rolle bei der Zellmigration sowie der Bildung von Fokaladhäsionen und ist für gegensätzliche Funktionen in einigen Erkrankungen bekannt (Langhe et al., 2016; D. Li et al., 2021; G. Zhang et al., 2023). Sowohl orale adenoidzystische Karzinome als auch fibrotisches Speicheldrüsengewebe aus Sjögren-Syndrom-Erkrankten weisen erhöhte CDH11-Expression auf (W. Li et al., 2021; H. Yin et al., 2021). In Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen hingegen unterdrückt es die Tumorentwicklung (G. Zhang et al., 2023). Cadherin 11 ist essentiell zur Bildung fokaler Adhäsionen (Langhe et al., 2016; D. Li et al., 2021). In gesundem Speicheldrüsengewebe sind Fokaladhäsionen besonders in der Entwicklung von Bedeutung (Bonnet et al., 2023; Sequeira et al., 2012). Da das Genexpressionsprofil der hPDSCs in adhärenz DMEM/F12-Kultur nicht auf eine ausgereifte Speicheldrüsendifferenzierung hindeutete, könnte die geringere Expression von Nachteil in der Entwicklung eines Speicheldrüsenmodells aus hPDSCs sein. Eine exakte Hypothese über die Bedeutung der geringen CDH11-Genexpression für die hPDSCs ließ sich aufgrund der variablen Rollen von Cadherin 11 nicht aufstellen.

Die Genexpression der untersuchten Speicheldrüsenmarkergene zeigte jedoch keine bedeutenden Vorteile der adhärenz in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs gegenüber anderen adhärenz primären Speicheldrüsenzellkulturen. Experimente anderer Forschungsgruppen brachten adhärenz kultivierte epitheliale Speicheldrüsenzellkulturen hervor, die nach adrenerger Stimulation α -Amylase 1 sezernieren können (Chopra & Xue-Hu, 1993; B.-X. Zhang et al., 2015). Auch die Zelllinien HSY und HSG, die aus Gang- oder Tumorzellen etabliert wurden, sind unter den entsprechenden Kulturbedingungen in der Lage, azinäre Eigenschaften anzunehmen (Rose et al., 2023). Der Vorteil der hPDSC-Kultur, dass sie aus einem kleinen humanen Gewebsfragment viele Zellen generieren kann, könnte Einsatz in regenerativen Therapien und industriellen Substanztestungen finden. Solange die hPDSCs jedoch Anzeichen von Dedifferenzierung in hohen Passagen zeigen und das Differenzierungsmedium die hPDSCs nicht mit azinären Eigenschaften ausstattet, können sie nicht als Testsystem eingesetzt werden.

4.2 hPDSCs in 3D-Kultur - Sphäroide mit Speicheldrüsencharakter?

Die hPDSCs ließen sich in serumhaltigem Medium über 7 Tage in AMP kultivieren und bildeten kompakte, vitale Sphäroide. Die Sphäroide wiesen Strukturen an der Oberfläche auf, die Nestin-positiv sein können und sezernierten eine Kollagen IV-haltige EZM. Außerdem wurden viele Gene transkribiert, dessen Produkte für eine funktionale Speicheldrüsen-EZM relevant sind.

MORPHOLOGIE, VITALITÄT UND PROLIFERATION DER SPHÄROIDE

Die Vitalität der hPDSC-Sphäroide in serumhaltigen Medien nach 7 Tagen in AMP-Kultur war auf einem hohen Niveau: nahezu 100 % der Sphäroide in einer AMP bestanden überwiegend aus metabolisch aktiven Zellen; nur sehr wenige Sphäroide einer Zelllinie in serumhaltiger Kultur zeigten in der AMP-Übersicht auch tote Zellen. Für die Erhaltung der Vitalität in serumhaltigen Medien schien die eingesetzte Zellzahl pro Sphäroid angemessen zu sein. Die Vitalität der in serumhaltigem Medium kultivierten Sphäroide war vergleichbar mit anderen dreidimensionalen zellulären Speicheldrüsenmodellen (Shin, Hong, et al., 2018). Die eingesetzte Zellzahl wurde am Protokolls für hängende Tropfen angelehnt, da die eingesetzten Zellzahlen in der Literatur zu Speicheldrüsen-sphäroiden stark variieren: es gibt sowohl Ansätze, Organoide aus einer einzelnen Zelle sowie aus Millionen Zellen zu züchten (Adine et al., 2018; Kruse & Fuhr, 2007; Sui et al., 2020).

Je nachdem, welchen Zweck das etablierte Sphäroidmodell verfolgen soll, ist die Größe zu wählen: Sphäroide mit einem Durchmesser bis etwa 200 μm sind besser für Tissue Engineering und regenerative Therapieansätze geeignet, wohingegen größere Sphäroide (ab etwa 500 μm Durchmesser) aufgrund potenzieller hypoxischer Effekte im Inneren besser für Tumormodelle geeignet sind (Decarli, Mizukami, et al., 2022). Die hPDSC-Sphäroide zählten mit ihrer Größe zu der kleineren Gruppe, was zur angestrebten Funktion als gesundes Speicheldrüsenmodell passte. Die Forschungsgruppe um Decarli arbeitete mit Mikromulden mit einem Durchmesser von etwa 1,1 mm an der Öffnung, verschiedenen Stammzelltypen und mehreren Tausend Zellen pro Mulde (Decarli, De Castro, et al., 2022). Dabei fanden sie heraus, dass die Größe der Sphäroide von vielen

Faktoren beeinflusst wird; z. B. eingesäte Zellzahl, Zelltyp, Kompaktheit über die Zeit, Lage der Mulde in der AMP (Decarli, De Castro, et al., 2022). Ähnliche Beobachtungen sind auch im Laufe der Experimente zu dieser Arbeit gemacht worden (nicht quantifiziert und abgebildet).

Um einen Eindruck über das Wachstum der hPDSC-Sphäroide zu erlangen, wurde die Größe der Sphäroide in Form der Aufsicht der Oberfläche an Tag 1, 3 und 7 nach Aussaat gemessen (siehe Abbildung 10). Die dazu verwendeten Aufnahmen wurden vornehmlich vom Zentrum der AMP gemacht, um Schwankungen durch die Lage im AMP zu vermeiden.

In DMEM10 kultivierte Sphäroide schienen von Tag 1 zu Tag 3 zu schrumpfen; in DMEM/F12-EGF kultivierte Sphäroide schienen über die gesamte Kultur gleich groß zu bleiben. Die Varianzanalyse zeigte zum Zeitfaktor eine signifikante Änderung an ($p(\text{Zeit}) < 0,05$). Die Analyse ließ aber keine Aussage darüber zu, zu welchem Zeitpunkt die Konditionen oder die Sphäroide innerhalb einer Kondition signifikant voneinander abwichen (ANOVA: $p(\text{Medium}) > 0,05$; $p(\text{Interaktion}) > 0,05$; *post hoc* Tukey, alle Vergleiche: $p > 0,05$). Unveröffentlichte Ergebnisse aus Zeitraffer-Aufnahmen von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen, die nach demselben Protokoll in AMP kultiviert wurden, legten den Schluss nahe, dass die Zellen sich in den Sphäroiden kompakter umlagerten. Das könnte erklären, warum die Sphäroide in DMEM10 zunächst zu schrumpfen schienen. Die stärkere Proliferation in DMEM/F12-EGF könnte die Kompaktheit an Tag 3 ausgleichen, was zu der relativ unveränderten Sphäroidgrößenkurve führen würde.

Da am ersten Tag auch noch lose Zellansammlungen in den Mulden lagen und die Sphäroide später nicht exakt kugelförmig waren, konnte nicht immer eine klare Grenze um die Fläche der Aufsicht gezogen werden und die Fläche erschien größer. Um den Fehler gering zu halten wurde nicht auf eine einfache Durchmesser messung zurückgegriffen, sondern die Aufsichtsfläche gemessen. Die Zellansammlungen waren womöglich darauf zurückzuführen, dass sich noch nicht alle Zellen in das Sphäroid integriert hatten. Das hatte große Auswirkungen auf die Größenmessung: die Größe der Sphäroide in DMEM/F12-EGF-Kultur schien sich kaum zu ändern, obwohl sich die Morphologie in den 7 Tagen der Kultur änderte: von einem Haupt-Sphäroid mit nicht ganz abzugrenzenden Zellansammlungen in derselben Mulde zu kompakten Sphäroiden mit Auswölbungen. Auch das könnte die scheinbar gleichbleibende Größe der Sphäroide erklären.

Zuletzt ist auch eine Volumenänderung der Zellen nicht als Grund für unterschiedliche Sphäroidgrößen auszuschließen. Azinäre Zellen sind Volumenänderungen ausgesetzt, die zur Aktivierung von Chloridkanälen und einer funktionalen Speichelsekretion beitragen (Catalán et al., 2015; Derouiche et al., 2018). Diese Effekte könnten auch in den hPDSCs auftreten, da es sich um Zellen handelt, die von adulten Speicheldrüsenzellen abstammen.

Um diese Hypothesen zur Größe in den verschiedenen Medien sowie über die Zeit belegen zu können, bedarf es einer systematischen Größenmessung mit größerer Stichprobe, mehreren Zeitpunkten und festen Orten innerhalb der AMP sowie neuen Zeitraffer-Aufnahmen.

Die Morphologie der hPDSC-Sphäroide ließ noch keine Rückschlüsse auf glanduläre Eigenschaften zu: die Sphäroide sind relativ rund. Gelegentlich hatten sie länglichere, ovale Formen oder blasenähnliche Strukturen an der Oberfläche, aber keine Azini- oder Gangstrukturen (siehe Abbildung 9). Decarli und Kollegium streben möglichst uniforme, kugelförmige Sphäroide für Reproduzierbarkeit an (Decarli, De Castro, et al., 2022). Viele Forschungsgruppen, die zelluläre Speicheldrüsenmodelle entwickeln, streben hingegen strukturierte Organoiden an. Einige Protokolle ermöglichen bereits Speicheldrüsenstrukturen nachzustellen: die Formen der Sphäroide erinnern an Azini- und Gang-Strukturen (Joraku et al., 2007; Sui et al., 2020; Yoon et al., 2022). Die hPDSC-Sphäroide lassen sich zwischen den beiden Extremen von uniformen kugelförmigen Sphäroiden und strukturierten gewebeähnlichen Organoiden einordnen. Es waren keine Strukturen zu erkennen, die deutlich an Azini oder Gänge erinnerten, aber die Zellen bildeten Sphäroide unterschiedlicher Form und Struktur. Ein besonderes Maß an Strukturierung in den hPDSC-Sphäroiden offenbarte sich in den Immunfluoreszenzfärbungen: die Nestin-positiven Zellen befanden sich ausschließlich in der äußeren Zellschicht und teilweise in ausgewölbten Strukturen an der Sphäroidoberfläche (vgl. Abbildung 16). Wenn man ein Sphäroid mit einem sich entwickelnden Azinus vergleicht, erinnert die Lokalisation der Nestin-positiven Zellen an die in murinen Speicheldrüsen (Do Valle et al., 2022). Auch innerhalb von Sphäroiden aus embryonalen Stammzellen (EB, von engl. *embryoid bodies*) waren Nestin-positive Zellen ähnlich lokalisiert (Wiese et al., 2004). Die Existenz und Funktion von Nestin-positiven Zellen in gesunden humanen Speicheldrüsenzellen ist wenig erforscht. Nestin wurde im Kontext der Speicheldrüsen bisher mit der Proliferation von Krebszellen und rezidiven Kopf-Hals-Tumoren assoziiert, sowie als Marker für Speicheldrüsenkrebs identifiziert (Pérez-Sayáns

et al., 2021; Yanai et al., 2013). Do Valle und Kollegium betrachteten 2022 erstmals Nestin- und *Neuron-glia antigen 2*-positive Zellpopulationen um murine Azini und Gänge systematisch (Do Valle et al., 2022). Die Forschungsgruppe um do Valle schrieb von ähnlichen Beobachtungen in humanen Studien; eine systematische Untersuchung fehlte jedoch. In den für diese Arbeit gefärbten Parotisschnitten lagen vereinzelt Nestin-positive Zellen an der beschriebenen Stelle: längliche Zellen zwischen Azini (siehe Abbildung 16). Wiese und Kollegium beschrieben die Nestin-positiven Zellen in den EBs als Vorläuferzellpopulation, die proliferativ und in der Lage sind, bei Verletzungen des Gewebes rekrutiert zu werden (Wiese et al., 2004). Die Nestin-positive Zellpopulation in den hPDSC-Sphäroiden könnte eine solche Population multipotenter Stammzellen sein, die bei Anheftung der hPDSC-Sphäroide an Zellkulturplastik oder anderem Substrat beginnen zu migrieren. Unwahrscheinlich erscheint, dass die Zellen vergleichbar proliferativ wie Krebszellen sind, da Gene zum Zellzyklus in hPDSC-Sphäroiden geringer exprimiert wurden als in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur.

EIGENSCHAFTEN ADULTER SPEICHELDRÜSEN IN HPDSC-SPHÄROIDEN?

Um die hPDSC-Sphäroide auf die beabsichtigte Differenzierung zu Speicheldrüsengewebe zu testen, wurden in qRT-PCR und Immunfluoreszenzfärbungen sekretorische Marker untersucht. Die Sphäroide zeigten die erwünschte Markerexpression nicht in vollem Umfang, wiesen aber Tendenzen auf, sich zu einem Speicheldrüsenmodell entwickeln lassen zu können.

Sekretorische Marker

Die mRNA-Expression sekretorischer Markergene in den hPDSC-Sphäroiden aus DMEM/F12-EGF-Kultur deutete auf vielversprechende Speicheldrüseneigenschaften hin. Wie in den adhärenen Konditionen wurden die Gene für α -Amylase 1 und TMEM16A in hPDSC-Sphäroiden transkribiert. Einzigartig war die CHRM3-Expression in hPDSC-Sphäroiden: Während die hPDSCs in hohen Passagen adhärenter Kultur keine CHRM3-mRNA mehr aufwiesen, exprimierten hPDSC-Sphäroide in denselben Passagen CHRM3. AQP5 wurde zwar in Standardkultur in hohen Passagen exprimiert, aber nicht in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur. Sphäroide zeigten daher

eine signifikant höhere AQP5-Expression als in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur, was einen deutlichen Vorteil dieser Kulturmethode darstellt. Die Genexpression der sekretorischen Marker Aquaporin 5, CHRM3, TMEM16A und α -Amylase 1 wies auf epitheliale azinäre Zellen in den hPDSC-Sphäroiden hin.

Das Genexpressionsmuster der Gangmarker Keratin 7 und CFTR sprach gegen eine Differenzierung zu Gangzellen in den hPDSCs. CFTR wurde in keiner der Konditionen exprimiert (siehe Abbildung 8 und Abbildung 15). Während KRT7 in den hPDSCs in Standardkultur noch exprimiert wurde, verringerte das Differenzierungsmedium die KRT7-Expression stark. Das Gen von Keratin 7 befindet sich unter den Top 25 DEG des Medienvergleichs. KRT7 ist in der *Heatmap* in einem *Cluster* verortet, das Gene vereint, die in beiden Differenzierungskonditionen geringer exprimiert sind als in Standardkultur. Das spricht gegen eine Differenzierung zu Gangzellen durch DMEM/F12-EGF und die Sphäroidkultur.

Um die Translation der Marker-mRNA und Anordnung der Zellen und Proteine in einem polaren Monolayer zu prüfen, wurden in Immunfluoreszenzfärbungen mit entsprechenden Antikörpern angefertigt. Die Immunfluoreszenzfärbungen konnten keine distinkte Färbung der sekretorischen Marker AQP5, CHRM3 und TMEM16A in der basolateralen oder apikalen Membran nachweisen (siehe Anhang). Dies sprach gegen einen funktionalen epithelialen Monolayer. Die Dissonanz zwischen den Ergebnissen auf transkriptionaler und translationaler Ebene lässt sich womöglich auf die Stichprobengröße und Effekte der Zusammenführung von Sphäroiden zurückführen: Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an vergleichsweise wenigen, zufällig ausgewählten Sphäroiden durchgeführt. Möglicherweise wurden durch Effekte der Dichte oder Oberflächenbeschaffenheit der Sphäroide im Färbeprozess durch Abschwemmen abermals Sphäroide ausselektiert. Die RNA-Proben hingegen beruhten auf nahezu allen Sphäroiden einer AMP, die zu einer Probe zur RNA-Extraktion zusammengeführt wurden. In der RNA-Probe war also womöglich RNA einiger weniger Sphäroide enthalten, die Markergene transkribierten und translatierten; für die Immunfluoreszenzfärbung wurden solche Sphäroide möglicherweise nicht verwendet. Wenn die Sphäroide hingegen uniform waren, würde es bedeuten, dass die Sphäroide die sekretorischen Marker auf einem niedrigen Niveau exprimierten und womöglich nicht ordnungsgemäß translatierten und translokalisierten. Dies könnte auf einen geringen Differenzierungsstatus bzw.

eine frühe Entwicklungsstufe der hPDSC-Sphäroide hinweisen. Auf Grundlage der Untersuchung der sekretorischen Marker war von einer unvollständigen azinären Spezialisierung der hPDSC-Sphäroide nach 7 Tagen in Kultur auszugehen.

Zur weiteren Untersuchung der Strukturierung und EZM-Beschaffenheit der hPDSC-Sphäroide wurde die Hauptkomponente der Basalmembran Kollagen IV in einer Immunfluoreszenz-färbung adressiert. Die hPDSC-Sphäroide wiesen zwar Kollagen IV auf, die Färbung stellte aber neue Fragen in den Raum: warum waren einige hPDSC-Sphäroide von Kollagen IV-Fasern durchzogen und andere von den Fasern umschlossen? Wieso erschien die Färbung der Kollagen IV-Fasern in den hPDSC-Sphäroiden brüchiger als in der Kontrollfärbung der Parotis? Im folgenden Abschnitt wird die Expression der EZM-Gene, ihre Rolle in der Morphogenese der Speicheldrüse, die Ausprägung der beteiligten Moleküle in den hPDSC-Sphäroiden und somit auch Kollagen IV und der Differenzierungsstatus der Sphäroide näher betrachtet.

PARALLELEN ZUR SPEICHELDRÜSEN MORPHOGENESE BEI DER GENEXPRESSION IN hPDSC-SPHÄROIDEN

Das *Enrichment* der RNA-Seq-Daten wies auf eine Umstrukturierung der EZM durch die Kultur DMEM/F12-EGF sowie durch die Sphäroidkultur hin. Sowohl niedriger als auch höher exprimierte DEG beider Vergleich *enrichen* die Signalweggruppe „*Extracellular matrix organization*“. Anhand einer Liste von EZM-Proteinen aus muriner submandibulärer Speicheldrüse (engl. *submandibular gland* = SMG) wurden die Genexpressionsänderungen in den hPDSCs exemplarisch betrachtet. Diese Liste haben Tran et al. mittels Massenspektrometrie von SMG und azellularisierter SMG ermittelt. Außerdem wiesen sie eine differenzierungsfördernde Wirkung der EZM-Komponenten auf MSCs nach. Diese EZM-Bestandteile könnten auch in der Kultur der hPDSCs von Bedeutung sein. Zur Evaluierung der Ergebnisse wurde die Liste durch einige in der humanen Speicheldrüse und besonders in der Morphogenese relevante EZM-Gene ergänzt. Die Untersuchung der Expression dieser Gene vermittelt also sowohl einen Eindruck, ob die EZM der hPDSCs der EZM einer adulten Speicheldrüse ähneln könnte, als auch, ob die hPDSC-Sphäroide womöglich die EZM-Gene einer embryonalen Speicheldrüse exprimieren.

Die Liste der EZM-Gene erinnert an die Hauptakteure in der Spaltenbildung nach Mattingly und Kollegium: HSPGs, Kollagene und Laminine bilden einen Großteil ab (siehe Abbildung 2, schwarzer Kasten). Außerdem wäre die Bildung von Spalten in den hPDSC-Sphäroiden ein essenzieller Schritt, um sie zu strukturierten Organoiden zu entwickeln. Deshalb wurden besonders die an der Spaltenbildung beteiligten Molekülgruppen näher betrachtet.

Heparansulfatproteoglykane (HSPGs)

Eine bedeutende Gruppe der Proteoglykane sind Heparansulfatproteoglykane (HSPGs). HSPGs regulieren die Wirkung von Wachstumsfaktoren, indem sie als deren Ko-Rezeptoren oder Speicher dienen. Perlecan ist Ko-Rezeptor und Speicher von FGF10 in der Basalmembran muriner SMG (Patel et al., 2007). Das Gen von Perlecan (HSPG2) wurde in allen Konditionen der hPDSCs exprimiert, in DMEM/F12-EGF-Konditionen jedoch geringer als im Standardmedium. Auch Kollagen XVIII weist Eigenschaften der HSPGs auf. Das Gen COL18A1 war in hPDSC-Sphäroiden höher exprimiert als in adhärent kultivierten hPDSCs. HSPGs können die Funktionen anderer HSPG-Vertreter in Teilen übernehmen (Halfter et al., 1998). Somit könnte die erhöhte Expression des Kollagen XVIII-Gens und anderer HSPG-Gene womöglich die verringerte HSPG2-Expression ausgleichen.

Zwei weitere speicheldrüsenrelevante HSPGs sind Agrin und Periostin. Ihre Gene AGRN und POSTN wurden in adhärent in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs geringer exprimiert als in hPDSCs in Standardkultur. In hPDSC-Sphäroiden jedoch war die Expression beider Gene höher als in den adhärent in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs. Die dreidimensionale Kultur schien die gegenteilige Wirkung zum Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF zu haben. Dies erhöhte die Chancen für eine ordnungsgemäße Speicheldrüsenmorphogenese in hPDSC-Sphäroiden. Womöglich war das Expressionslevel von Perlecan jedoch nicht ausreichend, um Spaltenbildung zu unterstützen. HSPG2 ist in humanen fötalen Speicheldrüsen eins der am stärksten exprimierten Gene (Saitou et al., 2020). Außerdem ist anzunehmen, dass die anderen HSPGs nicht genau dieselben, sehr expliziten, Funktionen erfüllen können wie Perlecan. Eine ordnungsgemäße Morphogenese in den hPDSC-Sphäroiden konnte nicht gewährleistet werden. An einem weiterentwickelten Modell der hPDSC-Sphäroide könnte untersucht werden, inwiefern sich die HSPGs gegenseitig ersetzen können.

Auch Periostin wird in fötalen humanen Speicheldrüsen stark exprimiert. Die starke POSTN-Expression wird nur in der sublingualen Speicheldrüse im adulten Menschen aufrechterhalten (Saitou et al., 2020). Das erhöhte Periostin-mRNA-Level in hPDSC-Sphäroiden könnte für eine sublinguale Differenzierung oder den fötalen Entwicklungsstand der hPDSC-Sphäroide sprechen. Außerdem spielt Periostin eine Rolle in der Regeneration einiger Organe; u. a. im Pankreas durch Regulation der Zelldifferenzierungsentscheidung azinärer Zellen (Hausmann et al., 2016). Wenn Periostin auch in der Regeneration von Speicheldrüsenzellen diese Funktion erfüllt, stellt die erhöhte POSTN-Expression in hPDSC-Sphäroiden einen großen Vorteil der 3D-Kultur gegenüber adhärent differenzierten hPDSCs dar.

Kollagene

Der große Anteil von Kollagen IV-Untereinheiten an den EZM-Genen aus der Speicheldrüse, ist darauf zurückzuführen, dass Kollagen IV Hauptbestandteil der Basalmembran ist, die Azini und Gänge umschließt. Der hohe Anteil von Kollagen IV spiegelte sich auch in der Genexpression der Untereinheiten in hPDSC-Sphäroiden wider: Die Untereinheiten COL4A4, COL4A5 und COL4A6 wurden unverändert zu adhärent in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs exprimiert. Im Medienvergleich zeigte sich, dass die Genexpression von COL4A5 durch das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF erhöht wurde. Auch wenn COL4A5 in den hPDSC-Sphäroiden nicht höher exprimiert war als in 2D-DMEM/F12-EGF, ist davon auszugehen, dass die COL4A5-Expression in den Sphäroiden höher ist als in Standardkultur. Die Untereinheiten COL4A1 und COL4A2 wurden sogar stärker in Sphäroiden exprimiert (Abbildung 24). Das ist von besonderer Bedeutung, weil diese beiden Kollagen IV-Untereinheiten die ubiquitär in verzweigenden Organen vorkommende Kollagen IV-Tripelhelix bilden (Rebustini et al., 2009).

Die höhere Expression von Kollagen IV-Untereinheiten könnte auf eine Spezialisierung der EZM zur Basalmembran hindeuten. Die Basalmembran zeichnet ein hohes Maß an Organisation aus und sorgt für polare Orientierung, da sie ausschließlich an der basalen Seite der epithelialen Speicheldrüsenzellen liegt (Daley et al., 2012; Overeem et al., 2015; Yu et al., 2005). Diese Lokalisierung konnte in Immunfluoreszenzfärbungen der hPDSC-Sphäroide nicht einwandfrei nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 25). In manchen Sphäroiden bildeten die filamentösen Kollagen IV-Strukturen ein Netzwerk durch das gesamte Sphäroid; in anderen Sphäroiden

beschränkte sich das Kollagen IV auf die äußerste Zellschicht. Die Basalmembran würde man nur außerhalb der äußeren Zellschicht erwarten, wenn das Sphäroid einem Azinus ähnelte. Die diffus verteilten und teilweise brüchigen Kollagenstrukturen weisen auf fehlende Orientierung und Polarisierung der Zellen hin. Ein Grund dafür könnte die fehlende Expression einer Kollagen IV-Untereinheit sein. Das Gen COL4A3 wurde in den hPDSC-Sphäroiden nicht exprimiert. Eine andere Erklärung für den Unterschied in der Färbung könnte sein, dass die Zusammensetzung der Kollagen-Helices von der in adulten Speicheldrüsen abweicht.

Neben Kollagen IV spielen auch Kollagen I und III eine wichtige Rolle in den Speicheldrüsen: sie sammeln sich während der verzweigenden Morphogenese an sich bildenden Spalten und ihr Verdau durch Kollagenasen führt zu stark verringerter Spaltenbildung in murinen embryonalen SMG in *ex vivo*-Kultur (Nakanishi et al., 1986). Kollagen I ist der Hauptbestandteil allgemeiner EZM und COL1A1 ist in allen hPDSC-Konditionen exprimiert. Die COL3A1-Expression wird sogar signifikant durch die 3D-Kultur erhöht (vgl. Tabelle A. 2). Dies könnte darauf hindeuten, dass die hPDSC-Sphäroide sich an Tag 7 der Kultur im Stadium der Spaltenbildung befanden. In einer humanen Studie an Proben aller drei großen Speicheldrüsen ist die Expression der Kollagen-Untereinheiten COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL5A1 und COL5A2 in fötalen Speicheldrüsen besonders hoch eingestuft worden (Saitou et al., 2020). Dass diese Kollagen-Untereinheiten in hPDSC-Sphäroiden alle exprimiert oder sogar durch 3D-Kultur erhöht exprimiert wurden, bekräftigt die Hypothese, dass die hPDSC-Sphäroide sich in einem frühen Entwicklungsstadium befanden.

Bei COL3A1 und COL4A1 ist ein erhöhtes Expressionslevel nur in hPDSC-Sphäroiden nicht in adhärent in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs festzustellen. Dasselbe gilt für die Kollagenuntereinheiten COL18A1, COL4A2, COL6A1 und COL6A2, die in der Liste von EZM-Komponenten von Tran et al. aufgeführt sind. Diese Tatsache stützt die Hypothese, dass die Sphäroidkultur zur Differenzierung der hPDSCs zu Speicheldrüsenzellen stärker beitragen konnte als das Differenzierungsmedium allein.

Laminine

Laminine bilden einen essenziellen Anteil der Basalmembran und spielen ebenfalls eine Rolle in der Spaltenbildung der Speicheldrüsenmorphogenese (Durbeek et al., 2001; Kadoya et al., 1995, 1997;

Rebustini et al., 2007). Auch in der Liste der EZM-Bestandteile, die die Differenzierung von MSCs zu Speicheldrüsenzellen fördern befinden sich viele Laminin-Untereinheiten (siehe Tabelle A. 2; O. N. Tran et al., 2022). Unter diesen Laminin-Untereinheiten befinden sich LAMB1 und LAMC1, die neben LAMA1 das Trimer Laminin 111 bilden. Die dreidimensionale Kultur von epithelialen Speicheldrüsenzellen in polymerisiertem Laminin 111 unterstützt die Organoidbildung ähnlich wie die Kultur in Matrigel (Hosseini et al., 2018). LAMC1 wurde außerdem als ein stark exprimiertes Gen in humanen fötalen Speicheldrüsen identifiziert (Saitou et al., 2020). Die Bindung von Laminin γ 1 an Nidogen ist essenziell in der verzweigenden Morphogenese (Kadoya et al., 1997). Die LAMC1-Expression in hPDSCs war nicht differenziell, jedoch deutlich messbar. Das Gen von Nidogen NID1 wurde durch DMEM/F12-EGF höher exprimiert als in Standardkultur, was auf EGF im Medium zurückzuführen sein könnte (Kadoya et al., 1997). Die Genexpression von LAMA1 sowie LAMB1 in den hPDSCs wurde sowohl durch das Differenzierungsmedium als auch die Sphäroidkultur erhöht. Die erhöhte Expression dieser Gene bietet gute Voraussetzungen für eine Spaltenbildung in den hPDSC-Sphäroiden. Die Untereinheit Laminin α 1 ist besonders zu Beginn der Morphogenese von Bedeutung (Kadoya et al., 1995). Die Bindung von Laminin α 1 an α -Dystroglykan oder Integrin α 6 ist essenziell für eine ordnungsgemäße Verzweigung der Speicheldrüse (Durbeej et al., 2001; Kadoya et al., 1995). DAG1, das Gen von α -Dystroglykan, wird in hPDSCs unverändert in allen Konditionen exprimiert. Obwohl das im Differenzierungsmedium enthaltene EGF die Wirkung haben kann, die ITGA6-Expression zu erhöhen, wurde das Gen von Integrin α 6 in DMEM/F12-EGF-Konditionen niedriger exprimiert als in Standardkultur (Kashimata & Gresik, 1997). Womöglich war das Niveau der Integrin α 6-Expression nicht ausreichend für eine ordnungsgemäße verzweigende Morphogenese der hPDSC-Sphäroide. Dies könnte ein Grund für die unverzweigten, nicht ausdifferenzierten hPDSC-Sphäroide sein.

Die erhöhte LAMA1- und die niedrigere LAMA5-Expression sind ein weiteres Indiz dafür, dass die hPDSC-Sphäroide sich in einem Stadium zu Beginn der verzweigenden Morphogenese befanden. Die LAMA1-Expression sinkt in SMG bei voranschreitender Morphogenese, während die LAMA5-Expression steigt (Kadoya et al., 2003; Rebustini et al., 2007). LAMA5 trägt nicht nur zu einer normalen Basalmembran-Zusammensetzung, Spaltenbildung und Verzweigung, sondern auch zur Organisation und Differenzierung der azinären und Gangzellen bei (Rebustini et al., 2007). Letzteres weist auf die Bedeutung von LAMA5 in der späteren Morphogenese der Speicheldrüse hin. In

hPDSCs in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur war LAMA5 höher exprimiert als in Standardkultur. In hPDSC-Sphäroiden war die LAMA5-Expression wiederum niedriger als in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur (vgl. mit Tabelle A. 2). Dies verdeutlicht abermals, dass die hPDSC-Sphäroide sich in einem frühen Entwicklungsstadium befunden haben könnten.

Die anderen Laminin-Untereinheiten aus der Liste der EZM-Gene (Tabelle A. 2) sind LAMA2, LAMA4 und LAMB2. Alle drei Gene wurden in den hPDSCs exprimiert; die LAMA2-Expression wurde sogar sowohl durch das Differenzierungsmedium als auch durch die 3D-Kultur erhöht.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Expression differenzierungsfördernder Laminin-Untereinheiten durch die Differenzierungsbedingungen unterstützt wurde. Außerdem deutet das Expressionsmuster der Laminin-Untereinheiten an, dass die hPDSC-Sphäroide sich in einem frühen Entwicklungsstadium der Speicheldrüse befanden.

Fibronektin

Eines der wichtigsten Moleküle bei der Spaltenbildung ist Fibronektin (Gen FN1). Fibronektin ist ein Zelladhäsionsprotein, das die EZM über Integrine an die Zellen bindet, während die Zell-Zell-Verbindungen über E-Cadherin bei der Spaltenbildung zurückgehen (Sakai et al., 2003).

FN1 wurde in hPDSCs in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur höher exprimiert als in Standardkultur. In adhärent und dreidimensional in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs unterschied sich die FN1-Expression nicht. Somit ist davon auszugehen, dass die FN1-Expression durch das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF gesteigert wurde und, dass die Expression vermutlich auch in hPDSC-Sphäroiden höher als in Standardkultur war. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für Spaltenbildung in den hPDSC-Sphäroiden dar.

Fibronektin aktiviert einen Signalweg, der die Expression von E-Cadherin (CDH1) inhibiert (Onodera et al., 2010). Die CDH1-Expressionsdaten erzeugten keine signifikanten Ergebnisse in den DEA, sodass sich keine Aussage über die Expression des E-Cadherin-Gens in den unterschiedlichen hPDSC-Konditionen treffen lässt. An einer sich bildenden Spalte in der Speicheldrüsenentwicklung ist ein Rückgang von E-Cadherin zu erwarten. E-Cadherin sollte aber an anderer Stelle in Speicheldrüsenzellen lokalisiert sein und wird in der Speicheldrüsenentwicklung stark exprimiert, um Zell-Zell-Interaktionen zu vermitteln (Hsu & Yamada, 2010). Eine ubiquitär geringe Expression

des E-Cadherin-Gens in hPDSC-Sphäroiden könnte bedeuten, dass diese essentiellen Zell-Zell-Interaktionen fehlen. Die Untersuchung der Translation und Lokalisation von E-Cadherin könnte Aufschluss über die fehlende Strukturierung der hPDSC-Sphäroide geben.

Wachstumsfaktoren

Die Wachstumsfaktoren der FGF- und EGF-Familien sind besonders relevant für die verzweigende Morphogenese und epitheliale Differenzierung (Chibly et al., 2022).

FGF-Vertreter spielen in der Spaltenbildung eine besondere Rolle (siehe Abbildung 2). Die Untersuchung der Genexpression der Wachstumsfaktoren ist aber nicht der beste Ansatz, um den Ablauf der Signalkaskaden in hPDSCs einschätzen zu können. Die native Quelle von FGF für die Speicheldrüse während der Embryogenese sind mesenchymale Zellen (Patel et al., 2007). Diese sind in der 3D-Kultur nicht enthalten. Demnach könnte eine FGF-Supplementierung erforderlich sein. Anhand der geringeren HSPG2-Expression in den Differenzierungs-konditionen ließ sich bereits eine weitere Komplikation für die FGF-Signalkaskade ablesen: Perlecan, der Speicher sowie Ko-Faktor für FGF7 und FGF10, könnte unzureichend exprimiert sein. Connexin 43 ist ein Zellverbindungs-molekül, welches FGF 10-abhängige Signalkaskaden in epithelialen Speicheldrüsenzellen während der verzweigenden Morphogenese reguliert (Yamada et al., 2016). Das Connexin 43-Gen GJA1 wurde sowohl durch das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF als auch durch die dreidimensionale Kultur höher exprimiert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass FGF-Signalkaskaden zur verzweigenden Morphogenese in hPDSC-Sphäroiden ordnungsgemäß ablaufen könnten. Schließlich fehlt jedoch die Information über die Expression und *Splice*-Varianten des Rezeptors FGR2 in den hPDSCs, um eine Aussage über die Funktionalität der FGF-Signalwege zu treffen (Lombaert et al., 2013; Steinberg et al., 2005; Y. Zhang et al., 1999).

Ein weiteres Gen, dessen Produkt Auswirkungen auf einen Signalweg der Speicheldrüsen-morphogenese hat, wurde in dem *Cluster* der *Heatmap* aus DEG, die in hPDSC-Sphäroiden höher exprimiert sind, identifiziert: die Pseudokinase FAM20A. Fehlende Expression von FAM20A wirkt sich abschwächend auf den BMP/ERK-Signalweg aus. In der Speicheldrüsenmorphogenese führt das u. a. zu diffus verteilter AQP5-Expression (M. Yin et al., 2022). Die höhere Genexpression von FAM20A in hPDSC-Sphäroiden stellt also einen Vorteil der dreidimensionalen Kultur dar.

Außerdem weist diese Beobachtung auf das Potenzial hin, das die fortführende Analyse der *Gen-Cluster* bietet.

Der Wachstumsfaktor EGF wurde supplementiert, die Auswirkungen dessen erschienen widersprüchlich: die Genexpression von Nidogen 1 wurde erhöht, während Integrin $\alpha 6$ durch das EGF-haltige Differenzierungsmedium sogar niedriger exprimiert wurde. EGF-Supplementierung ist dafür bekannt, die Expression beider Gene zu erhöhen und beide Genprodukte sind essenziell für eine ordnungsgemäße Verzweigung (Kadoya et al., 1995, 1997, 2022). Womöglich hat die EGF-Konzentration nicht ausgereicht, um die ITGA6-Expression zu fördern. Nidogen 1 ist ubiquitär in der Basalmembran und tritt vermehrt an sich bildenden Spalten auf (Kadoya et al., 2022). Die erhöhte NID1-Expression in beiden DMEM/F12-EGF-Konditionen zeigt den positiven Effekt des Mediums auf die Entwicklung der hPDSCs. Außerdem ist die NID1-Expression ein weiteres Indiz für den frühen Entwicklungsstatus der Sphäroide. Die Supplementierung mit dem Wachstumsfaktor EGF reichte jedoch nicht, um eine verzweigende Morphogenese und Speicheldrüsendifferenzierung zu induzieren.

4.3 Der Einfluss der Zellkulturbedingungen – Chemische oder mechanische Reize...oder beides?

Die Organogenese der Speicheldrüse ist ein gutes Beispiel dafür, dass nur das Zusammenspiel von chemischen und mechanischen Reizen aus undifferenzierten Zellen ein funktionales Organ erzeugt.

Auch in dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Umgebungsbedingungen die Genexpression und somit die Differenzierung der hPDSCs stark beeinflussen. Die Kulturbedingungen prägten das Transkriptom stärker als die Einflussfaktoren „Patient“ und „Isolationsprozess“. Sowohl in der Hauptkomponentenanalyse aller *counts* als auch in der *Heatmap* der Top 50 DEG bildeten diejenigen Proben *Cluster*, die unter denselben Bedingungen kultiviert wurden. Dies erscheint logisch, da es sich bei den hPDSCs um Zellen mit dem Potenzial zur Differenzierung in verschiedene Keimblätter handelt (Petschnik, 2011). Das stammzellähnliche Potenzial der hPDSCs äußert sich in dieser Arbeit abermals; hier in Form der differenziellen Genexpression als Reaktion auf die Kulturkonditionen.

Die Anzahl der DEG im Medienvergleich war höher als im 2D-3D-Vergleich (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Demnach hatte die Umstellung auf ein anderes Medium bereits einen großen Einfluss auf die Genexpression. Die 3D-Kultur bringt die hPDSCs aber dazu, die Expression EZM-bezogener und Morphogenese-relevanter Gene stärker zu ändern als das Medium. Dabei verringert sich die Genexpression mancher EZM-Gene zwar durch die 3D-Kultur. Über ein Viertel der EZM-Gene wird jedoch durch die Sphäroidkultur höher exprimiert. Fast die Hälfte der untersuchten EZM-Gene wird in den hPDSCs in adhärenter DMEM/F12-EGF-Kultur messbar exprimiert oder sogar durch DMEM/F12-EGF erhöht exprimiert. Fast Dreiviertel der Gene werden in hPDSC-Sphäroiden exprimiert oder höher als in Standardkultur exprimiert; davon die Hälfte erhöht durch die Sphäroidkultur, nicht das Medium.

Aber nicht nur auf die untersuchten Speicheldrüsen-EZM-Gene hatte die Sphäroidkultur einen positiven Einfluss. Auch die sekretorischen Marker AQP5 und CHRM3, deren Expression in hohen Passagen in der adhärenten DMEM/F12-EGF-Kultur nicht mehr messbar war, wurden in den hPDSC-Sphäroiden exprimiert.

Der Großteil der Daten weist darauf hin, dass die hPDSC-Sphäroide sich in einer Entwicklungsstufe befanden. Da die hPDSCs aus adulten Zellen dedifferenziert worden sind, lässt sich nicht sagen, dass die hPDSC-Sphäroide sich in einem bestimmten embryonalen Entwicklungszustand befanden. Die Mehrheit der in Sphäroiden exprimierten EZM-Gene deutet jedoch auf einen Zustand ähnlich der embryonalen Phase hin, in der die Spaltenbildung beginnt. Die fehlende oder niedrigere Expression von Gangzellenmarkern CFTR und Keratin 7 in den beiden Differenzierungskonditionen sowie die Expression einiger azinärer Marker (AQP5 nur in Standard und 3D; CHRM3 nur in 3D) deutet eine Differenzierung Richtung azinäre Zellen an.

Das Differenzierungsmedium DMEM/F12-EGF hatte einen positiven Einfluss auf einen kleinen Anteil der untersuchten Gene. Die Kultur der hPDSCs in einem dreidimensionalen Zellverbund zeigte jedoch deutliche Vorteile gegenüber der adhärenten Kultur. Die hPDSC-Sphäroide stellen damit einen vielversprechenden Ansatz für ein Speicheldrüsenmodell dar.

4.4 Limitationen und Ausblick

Die adhärenzte Kultur ist in vielerlei Hinsicht limitiert. Die chemische Stimulation der hPDSCs mit KSFM oder DMEM/F12-EGF hat nicht ausgereicht, um die Zellen zu azinären Speicheldrüsenzellen zu differenzieren. Von der Expression der untersuchten exprimierten EZM-Gene könnten nur die Sphäroide profitieren. Während die adhärenz kultivierten Zellen die Form des starren Substrats annehmen müssen, könnten die Sphäroide eine verzweigende Morphogenese und somit Differenzierung durchlaufen. Deswegen fokussiert sich der folgende Abschnitt darauf, welche Experimente und Einsatzmöglichkeiten die Erkenntnisse zur Genexpression der EZM-Gene für die hPDSC-Sphäroide implizieren.

Zunächst sind methodische Weiterentwicklungen notwendig; besonders in Bezug auf die Kulturkonditionen, die RNA-Seq-Auswertung und die Untersuchung der Marker auf Proteinebene. Um die adäquaten Konditionen für eine serumfreie Kultur eines funktionalen Speicheldrüsenorganoids zu etablieren, sollte man in zukünftigen Experimenten an folgenden Faktoren arbeiten:

1. Alter/Passage/Einfrier-Auftau-Zyklen der Zellen
2. Eingesäte Zellzahl
3. Medienumstellung von serumhaltig zu serumfrei
4. Kulturdauer
5. Supplementierung von Wachstumsfaktoren
6. Supplementierung oder Überschichtung mit EZM-Proteinen
7. Ko-Kulturen

[1] Um die Dedifferenzierungserscheinungen in den hPDSCs in höheren Passagen zu vermeiden, sollten die Zellen möglichst direkt nach Isolation vermehrt und ohne Einfrier-Auftau-Zyklus in Sphäroidkulturen gebracht werden. Dies ist aufgrund der Vorexperimente und der großen eingesetzten Zellzahlen in dieser Arbeit nicht praktikabel gewesen. Der Einsatz von DMEM/F12-EGF in jüngeren Passagen könnte dabei helfen, schneller an die erforderliche Zellzahl für Sphäroidkultur zu gelangen. Es sollte jedoch auf Seneszenz- oder (De-) Differenzierungserscheinungen geachtet werden.

[2] Außerdem könnte eine Reduzierung der eingesäten Zellzahl in 3D-Kultur in Betracht gezogen werden. Die große Variation an Zellzahlen in bestehenden 3D-Modellen beweist, dass je nach Zelltyp eine andere eingesäte Zellzahl optimal sein kann. Deswegen bedarf die eingesäte Zellzahl einer systematischen Testung vergleichbar mit den Experimenten von Decarli und Kollegium. Diese Forschungsgruppe hat auch die Lage im AMP und die Bewegung beim Einsäen der Zellsuspension analysiert (Decarli, De Castro, et al., 2022). Aufgrund ähnlicher Beobachtungen in dieser Arbeit sollten auch solche Untersuchungen für die hPDSC-Kultur in Betracht gezogen werden.

[3] Des Weiteren gilt es, die Kultur in serumfreiem Medium zu optimieren. Die serumfreie Kultur ist aus ethischen und experimentellen Gründen erstrebenswert. Die adhärent in KSFM kultivierten Zellen zeigten ein vielversprechendes Expressionsprofil. Die undefinierte Zusammensetzung von Seren kann die Ergebnisse zu Experimenten von morphogenetisch relevanten Wachstumsfaktoren verfälschen. Außerdem erhöht tiererserumfreie Kultur die Chance auf Zulassung zum Einsatz in regenerativen Therapien. Demnach wäre ein mögliches Vorgehen, die Medienumstellung nach Herstellerempfehlung schrittweise durchzuführen. Auch die Adaption des Protokolls von Gao und Kollegium in Bezug auf Sphäroidkultur ist erfolgsversprechend (Gao et al., 2014).

[4] Da das Genexpressionsprofil der hPDSC-Sphäroide auf ein frühes Entwicklungsstadium hinweist, könnte eine längere Kulturdauer von Vorteil für die Differenzierung sein. Es sollte evaluiert werden, wie lange die Sphäroide vital bleiben, und ob sich der Differenzierungsgrad durch eine längere Kulturdauer erhöht.

[5] Um die Morphogenese und Strukturierung der Sphäroide zu unterstützen, könnte man dem Medium Wachstumsfaktoren der FGF-Familie zusetzen. Die hPDSC-Sphäroide exprimierten EZM-Gene, die auf einen frühen Entwicklungszustand hindeuten. Mattingly und Kollegium führen die Signaltransduktion von Vertretern der FGF-Familie als essenziell in dieser Phase an (siehe Abbildung 2, schwarzer Kasten, (Mattingly et al., 2015)). Neben der fehlenden FGF-Supplementierung wurde der FGF-Speicher und -Ko-Faktor Perlecan durch DMEM/F12-EGF geringer exprimiert. Das mRNA-Level und die daraus folgende Menge an Perlecan schien zu gering zu sein, um einen ordnungsgemäßen Ablauf der Morphogenese gewährleisten zu können. Die Supplementierung mit FGF7 und FGF10 könnte die geringere Expression von HSPG2 und den daraus womöglich entstehenden Mangel an Perlecan ausgleichen.

[7] Die Supplementierung mit FGF-Vertretern könnte auch über eine Ko-Kultur mit mesenchymalen Zellen erfolgen. FGF10 wird besonders zu Beginn der Verzweigung beinahe ausschließlich vom Mesenchym exprimiert, das die Speicheldrüse umgibt (Patel et al., 2007). Außerdem haben Hosseini und Kollegium gezeigt, dass FGF2 eine autokrine Wirkung auf mesenchymale Zellen hat, die wiederum die Verzweigung der epithelialen Zellen positiv beeinflusst (Hosseini et al., 2018). Die Ko-Kultur der hPDSCs mit mesenchymalen Zellen aus der Umgebung der Speicheldrüse könnte die Differenzierung der hPDSCs und eine drüsenähnliche Morphogenese enorm vorantreiben. Die Sphäroidkultur in Mikromulden ermöglicht eine simple Ko-Kultur-Technik: die hPDSCs lagern sich bereits nach einem Tag zusammen. Dann liegen die Sphäroide am Grund der Mulden und Zellen eines weiteren Typs könnten durch die Öffnung der Mulde hinzugegeben werden. Neben mesenchymalen Zellen und myoepithelialen Zellen könnten auch neuronale Zellen als Ko-Kultur geeignet sein (Emmerson et al., 2017; Ozdemir et al., 2017). Neuronale Stimulation wirkt sich positiv auf die Zellregeneration azinärer Zellen aus (Emmerson et al., 2017). In zukünftigen Experimenten könnte erforscht werden, ob auch hPDSCs in der Lage sind sich unter dem Einfluss neuronaler Stimulation zu azinären Zellen zu entwickeln.

[6] Eine weitere Variante, um den Mangel an Perlecan auszugleichen, ist die Sphäroide damit zu supplementieren. Perlecan findet bereits Einsatz als Beschichtung in der Zellkultur (Nakamura et al., 2014). Wenn man die Sphäroide in ein definiertes Perlecan-Gel einbettete, würde das HPSG nicht nur die Morphogenese vorantreiben können; das Gel würde zudem die Sphäroide fixieren. Man könnte angelehnt an das Protokoll von Song und Kollegium ein Mikrofluidiksystem implementieren und die hPDSC-Kultur als Organ-Chip einsetzbar machen (Song et al., 2021). Anders als Matrigel bieten definierte Hydrogele aus einem einzigen EZM-Protein die Möglichkeit, die Bedeutung des jeweiligen Proteins bei der Entwicklung des Modells gezielt herauszufinden. Auch Laminin-111 wurde bereits in dieser Form eingesetzt und untersucht: es ist essenziell in der verzweigenden Morphogenese und hat sich bereits als Hydrogel für ein dreidimensionales Speicheldrüsenmodell bewährt (Hosseini et al., 2018).

Nach den Maßnahmen zur Optimierung der Kulturbedingungen, sollten die Methoden zur Charakterisierung der hPDSC-Sphäroide angepasst und erweitert werden. So könnte das volle Potenzial des Speicheldrüsenmodells erfasst und ausgeschöpft werden.

Die Zugabe von definiertem Hydrogel aus einzelnen EZM-Komponenten erweitert auch das Einsatzgebiet des Modells: hPDSC-Sphäroide könnten zur Untersuchung der EZM in dreidimensionaler Kultur von Speicheldrüsenzellen dienen. Die EZM spielt eine große Rolle in der Embryonalentwicklung und der Differenzierung von Zellen *in vitro* (Bonnans et al., 2014; Guilak et al., 2009). Die Relevanz einer intakten Basalmembran zeigt sich in Untersuchungen an Speicheldrüsen von an Sjögren-Syndrom Erkrankten (Goicovich et al., 2003; Molina, 2006). Ein Speicheldrüsenmodell, in dem der Einfluss einzelner EZM-Bestandteile untersucht werden kann, ist somit von großer Bedeutung. Experimente mit definierter Zugabe von Wachstumsfaktoren und EZM-Proteinen, wie für FGF und Perlecan beschrieben, können neue Informationen zur Speicheldrüsenmorphogenese und den einzelnen beteiligten Molekülen liefern. Die Kultur in Mikromulden bietet die einzigartige Gelegenheit, dies unter Ausschluss einer undefinierten Matrix wie Matrigel zu untersuchen.

hPDSC-Sphäroide haben womöglich das Potenzial als Modell zur Untersuchung von Volumenänderungen der Zellen zu dienen. Dazu muss zunächst die Ursache der Größenänderung der Sphäroide bestimmt werden, z. B. durch Zeitrafferaufnahmen von hPDSC-Sphäroiden während der Kultur. Sowohl die Erfassung sichtbarer Zellteilungen als auch die Beobachtung der Entstehung der blasenähnlichen Ausstülpungen könnten helfen, die Ursache für Größenentwicklung der Sphäroide zu finden. Außerdem sollte die finale Zellzahl bestimmt werden. Dies könnte über eine Zellkernzählung nach enzymatischem Verdau oder in einer 3D-Aufnahme der Sphäroide erfolgen. Der Vergleich von eingesäter und finaler Zellzahl könnte enthüllen, worauf die Größenänderungen der Sphäroide zurückzuführen sind. Wenn sich herausstellt, dass die hPDSCs in dreidimensionaler DMEM/F12-EGF-Kultur nicht mehr Zellen enthalten als in DMEM10, könnte die Beobachtung der größeren Sphäroide in DMEM/F12-EGF auf Volumenänderungen der Zellen beruhen. Nach einer Bestätigung dieser Hypothese und der Entwicklung von azinären Zellverbänden innerhalb der hPDSC-Sphäroide, wären sie geeignet als Modell zur Untersuchung von Zellvolumenänderungen.

Die RNA-Seq-Daten bieten viele weitere Möglichkeiten der Analysen und Deutungen, da es noch keinen Goldstandard in der RNA-Seq-Auswertung für jedwedes experimentelle Design gibt. Bereits bei der Erzeugung der Daten sollte man darauf achten, alle Proben auf einer Durchflusszelle zu sequenzieren. Bei den bioinformatischen Tools zur Datenaufbereitung und statistischen Analyse bestehen unzählige weitere Optionen zur Optimierung oder zur Untersuchung anderer Zusammenhänge. Zur technischen Optimierung könnte man z. B. in Algorithmen einbeziehen, dass die Daten aus verschiedenen Sequenzierungsläufen stammen, die *Alignment*-Rate verbessern oder geringer exprimierte Gene sensitiver untersuchen (Liu et al., 2022; Musich et al., 2021). Die Überrepräsentationsanalyse ist nur eine Art des *Enrichments*. Wenn man weder auf OmicsBox noch auf reactome im Browser zurückgreift, sondern Analysen in R anstellt, kann man auf weitere Datenbanken sowie DEA- und *Enrichment*-Tools zurückgreifen, mit denen man die Sequenzierungsdaten auswerten kann (Al-Shahrour et al., 2004; Godoy et al., 2018; Kanehisa, 2000; Kaspi & Ziemann, 2020; Kuleshov et al., 2016; Peng et al., 2019; The Gene Ontology Consortium et al., 2023).

In den beiden ORA wurden nur DEG (edgeR: $p \leq 0,05$; FDR $\leq 0,05$) verwendet; somit wurden geringere Schwankungen in der Genexpression herausgefiltert und nicht in das *Enrichment* einbezogen. Für diesen Schwellenwert gab es keine biologische Indikation: weder vorangegangene Experimente deuteten darauf hin, noch der direkte Vergleich zu RNA aus humaner Parotis lieferte einen Schwellenwert. Diese Limitation besteht in beiden ORA-basierten *Enrichment*-Methoden und verringert somit die Sensitivität der Methoden. Bei FCS mittels *mitcb* hingegen wurden, statt nur der DEG, alle detektierten Gene in die *Enrichment*-Analyse einbezogen; also auch kleine Änderungen der Genexpression erfasst. Außerdem wurden beide ORA mithilfe von Tools durchgeführt, die gewisse Variablen voreingestellt und somit unveränderlich verwenden. Beispielsweise verwendeten die ORA-Tools alle Gene als Hintergrund-Genliste (eng. *background gene list*), was für nicht Genom-weite Studien wie Transkriptomanalysen nicht optimal ist. Somit verringern nicht eigens programmierte Tools die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der Analyse sowie Ergebnisse; auch durch mögliche Software-Updates (z. B. in OmicsBox).

Außerdem ist der hierarchische Aufbau der Signalwegdaten in den GO- und reactome-Datenbanken mit Vorsicht zu betrachten: Die hierarchische Struktur verstärkt künstlich die Relevanz der

Gengruppen oberer Ordnung, was die diese Gruppen in beeinflussten biologischen Prozessen falsch positiv in den Fokus rücken könnte. Die hierarchische Visualisierung im *enrichen* GO-Graph trug aber einen großen Teil dazu bei, das Ergebnis der FatiGO-ORA schneller zu verstehen. Die übergeordneten GO-Terms ließen Rückschlüsse auf die biologischen Prozesse zu, die durch spezielle untergeordnete und nicht sofort zuordenbare biologische Prozesse zunächst möglicherweise unbekannt erschienen. Der GO-Graph mit allen Prozessen war jedoch relativ groß und unübersichtlich, da die biologischen Prozesse oberster Ordnung sehr allgemeine Vorgänge beinhalten. Das Ergebnis des FCS barg das gegenteilige Problem: Die Zuordnung der Klassen zu übergeordneten biologischen Prozessen war schwer erkennbar und ließ sich nur durch intensive Recherche zu den funktionellen Klassen herausfinden. Die Visualisierung mit reactome hingegen ist intuitiv verständlich und die Gruppen oberster Ordnung sind für die erste Einordnung der Ergebnisse angemessen spezifisch.

Eine Tendenz war in allen drei *Enrichment*-Methoden erkennbar: Prozesse, die die DNA-Replikation, den Zellzyklus oder aber auch Reaktionen auf Stress und andere Stimuli betreffen, wurden in 2D-DMEM/F12-EGF gegenüber 2D-DMEM10 offenbar aktiviert; Gene, die ähnliche oder dieselben Prozesse betreffen, waren in der 3D-Kultur gegenüber 2D-DMEM/F12-EGF hingegen geringer exprimiert. Die Ergebnisse der reactome-ORA und mitch zeigten diese Übereinstimmungen besonders. Auch legten beide ORA nahe, dass besonders in hPDSC-Sphäroiden Prozesse zur Organisation der EZM hochreguliert waren.

Das Ergebnis der ORA in reactome bildete die größte Schnittmenge aller drei Enrichment-Methoden. Deswegen wurden die Ergebnisse der ORA in reactome als Grundlage für die weitere Auswertung verwendet.

Mit der großen Datenbank zu einzelnen Signalwegen ermöglicht reactome auch tiefgreifende Untersuchungen zur Beeinflussung einzelner Signalwege durch differenziell exprimierte Gene vorzunehmen (Gillespie et al., 2022). Detaillierte Darstellungen ausgewählter *enrichter* Signalwege erläutern beteiligte Reaktionen, die durch DEG beeinflusst wurden. Dies könnte für fortführende Analysen genutzt werden.

Zudem könnte man mehr als die Top 50 DEG in einer *Heatmap clustern* und in den *Clustern* weiter nach Stammzell- oder Sphäroid-spezifischen Markern suchen. In dieser Diskussion wurden aus den

Clustern beispielhaft der Gangmarker Keratin 7 und die in der Morphogenese relevante Pseudokinase FAM20A betrachtet. Diese Beispiele verdeutlichen das große Potenzial, das eine solche Untersuchung der *Cluster* bietet.

Es bleibt zu betonen, dass die Ergebnisse aus einer differentiellen Genexpressionsanalyse nicht als Quelle biologischer Fakten einzuordnen sind! Es lassen sich lediglich neue Hypothesen ableiten, die einer Bestätigung oder Widerlegung durch Experimente bedürfen, die die Genprodukte sowie ihre Funktionalität und Lokalisation untersuchen. Die RNA-Seq-Daten können keine Auskunft darüber geben, ob das Genprodukt translatiert und an welcher Stelle es in einer Zelle bzw. einem Sphäroid lokalisiert ist. Die Lokalisation der Genprodukte wie die der EZM-Moleküle ist jedoch besonders während der Morphogenese und für die Funktion der Speicheldrüse von größter Bedeutung. Des Weiteren sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Daten auf Grundlage gepoolter RNA einer Großzahl morphologisch heterogener Sphäroide beruhen.

Demnach sind in folgenden Experimenten die Ergebnisse der RNA-Seq zu EZM-Genen auf Proteinebene und auf Funktionalität zu testen. Durch weitere Immunfluoreszenzfärbungen könnte man die korrekte Translation und Lokalisation bestimmen. Es sollten besonders Antikörper für Proteine eingesetzt werden, die die Struktur der Zellen und ihrer EZM bestimmen. Färbungen mit Antikörpern gegen E-Cadherin, TJP1, Fibronectin, Perlecan und Kollagen I oder III könnten Aufschluss über das Maß an Organisation zu einem Monolayer oder zur Spaltenbildung geben. Ergänzend zu der Zugabe einzelner EZM-Komponenten könnten Immunfluoreszenzfärbungen Aufschluss geben, wie gewisse EZM-Proteine in der Speicheldrüsenmorphogenese involviert sind. Es sollte untersucht werden, wie Agrin in den hPDSC-Sphäroiden verteilt ist, während Perlecan gering exprimiert wird. Für andere HSPG-Vertreter ist beschrieben, dass sie die Funktionen anderer HSPG-Vertreter teilweise ersetzen können (Halfter et al., 1998). Die Agrin-Lokalisation und eine Ko-Färbung mit FGFR2b könnte Hinweise dafür liefern, ob Agrin die Funktion von Perlecan als FGF-Ko-Faktor übernimmt.

Dazu sollte man auch in Betracht ziehen, die Färbemethode zu verfeinern. Färbungen von mehr Sphäroiden aus einer AMP als bisher, könnten die Selektionseffekte verringern. Die Zahl der Organoide, die in Cell-Tak™-beschichteten ibidi-Schalen gefärbt werden und während des Färbeprozesses kleben bleiben, sollte erhöht werden. Aber auch Methoden wie die von Ivanov und

Grabowska könnten hilfreich sein: sie betten Sphäroide wie Gewebe ein, sodass eine Vielzahl an Sphäroiden gleichzeitig gefärbt werden kann (Ivanov & Grabowska, 2017).

Eine weiteres attraktives Einsatzgebiet der hPDSCs sind regenerative Therapien wie Transplantationen. Für dieses Anwendungsgebiet muss ausgeschlossen werden, dass die vermehrte Expression von EZM-assoziierten Genen auf eine fibrotische Differenzierung der hPDSCs hinweist. Exzessive Sekretion von EZM-Molekülen ist auch ein Symptom von Fibrose in alternden oder bestrahlten Speicheldrüsen (Cheng et al., 2011; Nelson et al., 2024). Deshalb sollten die hPDSC-Sphäroide darauf untersucht werden, ob sie weitere Anzeichen von Fibrose aufweisen, wie z. B. die Expression des Bindegewebswachstumsfaktors CTGF (von engl. *connective tissue growth factor* (Leask et al., 2002)). Sobald eine fibrotische Entwicklung ausgeschlossen ist, wäre es möglich, die hPDSC-Sphäroide in Transplantationsversuchen bezüglich ihrer Regenerationsfähigkeit zu charakterisieren. Der geringe Differenzierungsstatus könnte für eine Transplantation sogar von Vorteil sein: die hPDSCs sind noch in der Lage sind sich an die *in vivo*-Umgebung anzupassen. Indizien dafür sind die differenzielle Expression in den unterschiedlichen Konditionen sowie die Expression des Stammzellmarkers Nestin. Ob transplantierte hPDSCs eine ähnliche Plastizität aufweisen, wie die, die native Speicheldrüsenzellen bei der Regeneration zeigen, ist in Transplantationsexperimenten herauszufinden (Weng et al., 2018). Aufgrund ihrer humanen Herkunft und dem Kulturansatz ohne Matrigel sind hPDSC-Sphäroide attraktive Kandidaten für regenerative Therapien.

Der Einsatz in der Testung neuer bioaktiver Substanzen und industriellen Hochdurchsatzverfahren, setzt eine hohe Funktionalität voraus. Wenn optimierte Kulturbedingungen zu einer erhöhten Expression sekretorischer Marker führen, könnte man funktionale Tests wie *Calcium Imaging* mit Stimulatoren und Inhibitoren von muskarinergen Rezeptoren anschließen. Die von Buck etablierte Methode zum *Calcium Imaging* an Schweißdrüsen eignet sich zur Adaption für Tests mit den hPDSC-Sphäroiden. Die Sekretionsmechanismen in Schweiß- und Speicheldrüsen ähneln sich (Cui & Schlessinger, 2015; Proctor, 2016). In beiden Drüsen werden die sekretorischen Zellen sowohl über adrenerge als auch muskarinerge Stimulation aktiviert, was Buck im *Calcium Imaging* mit Schweißdrüsen visualisiert. Außerdem sorgen in beiden Drüsen Ionenkanäle und -pumpen dafür, dass eine erhöhte Natriumchloridkonzentration im Drüsenlumen den Einstrom von Wasser nach

sich zieht, wodurch Primärschweiß oder Primärspeichel entsteht. Das Verfahren zur Fixierung der Mikrogewebe wurde an den hPDSC-Sphäroiden bereits für die Immunfluoreszenzfärbungen etabliert. Ein *Calcium Imaging* an Speicheldrüsensphäroiden wäre eine bedeutende Weiterentwicklung der hPDSCs zum funktionalen Testsystem.

Ein klassischer und simpler Test auf Amylaseaktivität könnte Auskunft über die Sekretion des Speichelenzyms liefern. Die Spaltung von Amylopektin-Anthranilat durch α -Amylase 1 kann in fluometrischen Messungen mit den kultivierten Zellen oder mit Mediumüberstand erfolgen (Owen & Jordan, 1981). Die Sekretion von Speichelproteinen wird vorrangig durch adrenerge Stimulation aktiviert und erfolgt über Exozytose proteingefüllter Vakuolen. Die Ergänzung von adrenergen Inhibitoren könnte Aufschluss darüber geben, ob auch diese Rezeptortypen in dem Modell exprimiert wurden. Der Nachweis, dass auch der Proteinsekretionsmechanismus stimuliert werden kann, würde die hPDSC-Sphäroide als Speicheldrüsenmodell noch attraktiver machen.

4.5 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war, ein dreidimensionales zelluläres Speicheldrüsenmodell zu entwickeln, das azinäre Eigenschaften widerspiegelt ohne auf den Einfluss von Matrigel angewiesen zu sein. Außerdem sollten die Einflüsse von Differenzierungsmedium allein und Kultivierung im dreidimensionalen Zellverbund miteinander verglichen werden. Auf diese Weise sollte die Differenzierung der kultivierten hPDSCs evaluiert und die beste Kulturmethode für ein potenzielles Speicheldrüsenmodell identifiziert werden. Schließlich sollten anhand der Untersuchung des Expressionsprofils von EZM- und Morphogenese-assoziierten Genen Möglichkeiten zur Optimierung der Kulturbedingungen gefunden werden.

Beide Differenzierungsbedingungen hatten einen großen Einfluss auf die Expression von EZM-assoziierten Genen, förderten jedoch weniger die Expression der sekretorischen Marker. Die hPDSC-Sphäroide zeigten den höchsten Anteil an mRNA azinärer Marker (3 von 4 untersuchten Markergenen); die dazugehörigen Proteine konnten aber nicht nachgewiesen werden. Trotzdem zeigten die dreidimensional kultivierten hPDSCs deutliche Vorteile gegenüber den adhärent differenzierten hPDSCs. Bei genauerer Betrachtung der differenziell exprimierten Gene in hPDSC-Sphäroiden wurde deutlich, dass diese vermehrt EZM-assoziierte Gene exprimierten, die zu einer

ordnungsgemäßen Speicheldrüsenmorphogenese beitragen können. Dabei wurden ebenso Gene identifiziert, deren geringe Expression ein Grund für die fehlende Verzweigung der hPDSC-Sphäroide sein könnte. Die Expressionsaktivierung oder die Supplementierung dieser EZM-Bestandteile könnten die Optimierung des Modells enorm vorantreiben. Eine intakte Basalmembran und umgebende EZM sind essenziell für die Morphogenese und Speichelsekretion. In der Entwicklung von Gewebemodellen ist es üblich, den Zellen ein EZM-ähnliches Gerüst vorzugeben. Auch viele Speicheldrüsen-sphäroide werden unter dem Einfluss von EZM-Bestandteilen kultiviert. Weiterführende Untersuchungen zur EZM in Speicheldrüsen sind deshalb bisher abhängig von Tierversuchen und Probenmaterial von Erkrankten. Eine optimierte hPDSC-Sphäroidkultur mit Zellen, die EZM-Proteine auf physiologische Weise sezernieren, würde ermöglichen, die Rolle der einzelnen EZM-Komponenten ohne Tierversuch oder den Einfluss von xenogenen Proteinen untersuchen zu können.

Literatur

- 3R-Forschung*. (2023). Replace, Reduce, Refine. 3r-forschung.de
- Adine, C., Ng, K. K., Rungarunlert, S., Souza, G. R., & Ferreira, J. N. (2018). Engineering innervated secretory epithelial organoids by magnetic three-dimensional bioprinting for stimulating epithelial growth in salivary glands. *Biomaterials*, *180*, 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.011>
- Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2021). *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie* (J. Graw, Hrsg.; B. Häcker, A. Prowald, C. Horstmann, M. Bronold, P. Jacoby, R. Kraft, & E.-M. Miller, Übers.; Fünfte Auflage). Wiley-VCH.
- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., & Dopazo, J. (2004). FatiGO: A web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, *20*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg455>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Athwal, H., & Lombaert, I. (2019). 3D Organoid Formation from the Murine Salivary Gland Cell Line SIMS. *BIO-PROTOCOL*, *9*(19), Article 19. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3386>
- Aure, M. H., Konieczny, S. F., & Ovitt, C. E. (2015). Salivary Gland Homeostasis Is Maintained through Acinar Cell Self-Duplication. *Developmental Cell*, *33*(2), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.013>
- Baniebrahimi, G., Khanmohammadi, R., & Mir, F. (2019). Teeth-derived stem cells: A source for cell therapy. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(3), 2426–2435. <https://doi.org/10.1002/jcp.27270>
- Bécavin, T., Kuchler-Bopp, S., Kökten, T., Huck, O., Messaddeq, N., Lesot, H., Deveaux, E., Benkirane-Jessel, N., & Laetitia, K. (2016). Well-organized spheroids as a new platform to examine cell interaction and behaviour during organ development. *Cell and Tissue Research*, *366*(3), 601–615. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2487-6>
- Birenboim, R., Markus, A., & Goldstein, R. S. (2013). Simple generation of neurons from human embryonic stem cells using agarose multiwell dishes. *Journal of Neuroscience Methods*, *214*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.12.026>
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>

- Bonnet, H., Isidro Alonso, C. A., & Gupta, I. R. (2023). Submandibular gland epithelial development and the importance of junctions. *Tissue Barriers*, *11*(4), 2161255. <https://doi.org/10.1080/21688370.2022.2161255>
- Born, I. A., Schwechheimer, K., Maier, H., & Otto, H. F. (1987). Cytokeratin expression in normal salivary glands and in cystadenolymphomas demonstrated by monoclonal antibodies against selective cytokeratin polypeptides. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, *411*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1007/BF00713290>
- Bragiel, A., Wang, D., Pieczonka, T., Shono, M., & Ishikawa, Y. (2016). Mechanisms Underlying Activation of α 1-Adrenergic Receptor-Induced Trafficking of AQP5 in Rat Parotid Acinar Cells under Isotonic or Hypotonic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7), 1022. <https://doi.org/10.3390/ijms17071022>
- Brownell, A. G., Bessem, C. C., & Slavkin, H. C. (1981). Possible functions of mesenchyme cell-derived fibronectin during formation of basal lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(6), 3711–3715. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3711>
- Butterworth, P. J., Warren, F. J., & Ellis, P. R. (2011). Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage. *Starch - Stärke*, *63*(7), 395–405. <https://doi.org/10.1002/star.201000150>
- Catalán, M. A., Kondo, Y., Peña-Munzenmayer, G., Jaramillo, Y., Liu, F., Choi, S., Crandall, E., Borok, Z., Flodby, P., Shull, G. E., & Melvin, J. E. (2015). A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific *Tmem16A* gene ablation in the adult mouse salivary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415739112>
- Catalán, M. A., Nakamoto, T., Gonzalez-Begne, M., Camden, J. M., Wall, S. M., Clarke, L. L., & Melvin, J. E. (2010). Cftr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland: Functional interplay between Cftr and ENaC. *The Journal of Physiology*, *588*(4), 713–724. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.183541>
- Cattaneo, E., & McKay, R. (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*, *347*(6295), 762–765. <https://doi.org/10.1038/347762a0>
- Cheng, S. C. H., Wu, V. W. C., Kwong, D. L. W., & Ying, M. T. C. (2011). Assessment of post-radiotherapy salivary glands. *The British Journal of Radiology*, *84*(1001), 393–402. <https://doi.org/10.1259/bjr/66754762>
- Chibly, A. M., Aure, M. H., Patel, V. N., & Hoffman, M. P. (2022). Salivary gland function, development, and regeneration. *Physiological Reviews*, *102*(3), 1495–1552. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2021>

- Chopra, D. P., & Xue-Hu, I. C. (1993). Secretion of α -amylase in human parotid gland epithelial cell culture. *Journal of Cellular Physiology*, *155*(2), 223–233. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041550202>
- Cui, C., & Schlessinger, D. (2015). Eccrine sweat gland development and sweat secretion. *Experimental Dermatology*, *24*(9), 644–650. <https://doi.org/10.1111/exd.12773>
- Daley, W. P., Gervais, E. M., Centanni, S. W., Gulfo, K. M., Nelson, D. A., & Larsen, M. (2012). ROCK1-directed basement membrane positioning coordinates epithelial tissue polarity. *Development*, *139*(2), 411–422. <https://doi.org/10.1242/dev.075366>
- Decarli, M. C., De Castro, M. V., Nogueira, J. A., Nagahara, M. H. T., Westin, C. B., De Oliveira, A. L. R., Da Silva, J. V. L., Moroni, L., Mota, C., & Moraes, Â. M. (2022). Development of a device useful to reproducibly produce large quantities of viable and uniform stem cell spheroids with controlled diameters. *Biomaterials Advances*, *135*, 112685. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2022.112685>
- Decarli, M. C., Mizukami, A., Azoubel, R. A., Neto, P. I., Mota, C., Moraes, Â. M., Silva, J. V. L., & Moroni, L. (2022). Static systems to obtain 3D spheroid cell models: A cost analysis comparing the implementation of four types of microwell array inserts. *Biochemical Engineering Journal*, *182*, 108414. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108414>
- Dehne, E.-M., & Marx, U. (2020). Human body-on-a-chip systems. In *Organ-on-a-chip* (S. 429–439). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817202-5.00013-9>
- Deng, C., Zhang, Z., Xu, F., Xu, J., Ren, Z., Godoy-Parejo, C., Xiao, X., Liu, W., Zhou, Z., & Chen, G. (2022). Thyroid hormone enhances stem cell maintenance and promotes lineage-specific differentiation in human embryonic stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *13*(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02799-y>
- Derouiche, S., Takayama, Y., Murakami, M., & Tominaga, M. (2018). TRPV4 heats up ANO1-dependent exocrine gland fluid secretion. *The FASEB Journal*, *32*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1096/fj.201700954R>
- Do Valle, I. B., Gomes, N. A., Diniz, I. M. A., De Arruda, J. A. A., Almeida, T. F. A., Santos, M. S., Birbrair, A., Von Zeidler, S. V., & Silva, T. A. (2022). Nestin and Neuron-gial antigen 2 transgenes unveil progenitor units in murine salivary glands. *Archives of Oral Biology*, *134*, 105344. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105344>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Durbejj, M., Talts, J. F., Henry, M. D., Yurchenco, P. D., Campbell, K. P., & Ekblom, P. (2001). Dystroglycan binding to laminin α 1LG4 module influences epithelial morphogenesis of

- salivary gland and lung in vitro. *Differentiation*, 69(2–3), 121–134. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.690206.x>
- Emmerson, E., May, A. J., Berthoin, L., Cruz-Pacheco, N., Nathan, S., Mattingly, A. J., Chang, J. L., Ryan, W. R., Tward, A. D., & Knox, S. M. (2018). Salivary glands regenerate after radiation injury through SOX2-mediated secretory cell replacement. *EMBO Molecular Medicine*, 10(3), e8051. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708051>
- Emmerson, E., May, A. J., Nathan, S., Cruz-Pacheco, N., Lizama, C. O., Maliskova, L., Zovein, A. C., Shen, Y., Muench, M. O., & Knox, S. M. (2017). SOX2 regulates acinar cell development in the salivary gland. *eLife*, 6, e26620. <https://doi.org/10.7554/eLife.26620>
- Erickson, A. C., & Couchman, J. R. (2000). Still More Complexity in Mammalian Basement Membranes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(10), 1291–1306. <https://doi.org/10.1177/002215540004801001>
- Ertongur-Fauth, T. (2017). *Engineering novel human sweat gland cell lines using CRISPR/Cas9 and primary cell technologies* [Poster].
- Europäische Arzneimittelbehörde will noch nicht auf Tierversuche verzichten. (2023). *aerzteblatt.de*. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/140443/Europaeische-Arzneimittelbehoerde-will-noch-nicht-auf-Tierversuche-verzichten>
- Evans, R. L., & Turner, R. J. (1998). New insights into the upregulation and function of the salivary Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *European Journal of Morphology*, 36 Suppl, 142–146.
- Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Forner, O., Marin-Garcia, P., Arnau, V., D'Eustachio, P., Stein, L., & Hermjakob, H. (2017). Reactome pathway analysis: A high-performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1559-2>
- Frahm, S. (2014). *Systematische Untersuchung der Inkulturnahme adhärent wachsender Zellen*. Universität zu Lübeck.
- Freshney, R. I. (1990). *Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch*. Berlin, Boston: De Gruyter, 1990. <https://doi.org/10.1515/9783110889024>.
- Fukuda, Y., Masuda, Y., Kishi, J.-I., Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Nogawa, H., & Nakanishi, Y. (1988). The role of interstitial collagens in cleft formation of mouse embryonic submandibular gland during initial branching. *Development*, 103(2), 259–267. <https://doi.org/10.1242/dev.103.2.259>
- Gao, Y., Li, M., Zhang, X., Bai, T., Chi, G., Liu, J. Y., & Li, Y. (2014). Isolation, culture and phenotypic characterization of human sweat gland epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(4), Article 4. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1851>
- Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (2023).

- Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., ... D'Eustachio, P. (2022). The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>
- Godoy, P., Schmidt-Heck, W., Hellwig, B., Nell, P., Feuerborn, D., Rahnenführer, J., Kattler, K., Walter, J., Blüthgen, N., & Hengstler, J. G. (2018). Assessment of stem cell differentiation based on genome-wide expression profiles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1750), Article 1750. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0221>
- Goicovich, E., Molina, C., Pérez, P., Aguilera, S., Fernández, J., Olea, N., Alliende, C., Leyton, C., Romo, R., Leyton, L., & González, M. (2003). Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: Correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis & Rheumatism*, *48*(9), 2573–2584. <https://doi.org/10.1002/art.11178>
- Gorjup, E., Danner, S., Rotter, N., Habermann, J., Brassat, U., Brummendorf, T. H., Wien, S., Meyerhans, A., Wollenberg, B., Kruse, C., & von Briesen, H. (2009). Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *European Journal of Cell Biology*, *88*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.02.187>
- Gormley, M., Creaney, G., Schache, A., Ingarfield, K., & Conway, D. I. (2022). Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: Definitions, trends and risk factors. *British Dental Journal*, *233*(9), 780–786. <https://doi.org/10.1038/s41415-022-5166-x>
- Grobstein, C., & Cohen, J. (1965). Collagenase: Effect on the Morphogenesis of Embryonic Salivary Epithelium in vitro. *Science*, *150*(3696), 626–628. <https://doi.org/10.1126/science.150.3696.626>
- Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, *5*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
- Hajiabbas, M., D'Agostino, C., Simińska-Stanny, J., Tran, S. D., Shavandi, A., & Delporte, C. (2022). Bioengineering in salivary gland regeneration. *Journal of Biomedical Science*, *29*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00819-w>
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., & Cole, G. J. (1998). Collagen XVIII Is a Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(39), 25404–25412. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25404>
- Hallmann, R., Bruckner, P., Deutzmann, R., & Sorokin, L. (2022). Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion. In P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, & H.-G. Koch (Hrsg.),

- Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (S. 1223–1248). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-60266-9_71
- Hausmann, S., Regel, I., Steiger, K., Wagner, N., Thorwirth, M., Schlitter, A. M., Esposito, I., Michalski, C. W., Friess, H., Kleeff, J., & Erkan, M. (2016). Loss of Periostin Results in Impaired Regeneration and Pancreatic Atrophy after Cerulein-Induced Pancreatitis. *The American Journal of Pathology*, *186*(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.022>
- Hay, R. J., & Paul, J. (1967). Factors Influencing Glucose Flux and the Effect of Insulin in Cultured Human Cells. *The Journal of General Physiology*, *50*(6), 1663–1680. <https://doi.org/10.1085/jgp.50.6.1663>
- Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L., & Koch, H.-G. (Hrsg.). (2022). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-60266-9>
- Hilger, L. (2021). *Establishment of functional cell-based test systems of sweat glands and parotid glands* [Poster].
- Hong, H. J., Cho, J.-M., Yoon, Y.-J., Choi, D., Lee, S., Lee, H., Ahn, S., Koh, W.-G., & Lim, J.-Y. (2022). Thermoresponsive fiber-based microwells capable of formation and retrieval of salivary gland stem cell spheroids for the regeneration of irradiation-damaged salivary glands. *Journal of Tissue Engineering*, *13*, 204173142210856. <https://doi.org/10.1177/20417314221085645>
- Horeth, E., Bard, J., Che, M., Wrynn, T., Song, E. A. C., Marzullo, B., Burke, M. S., Popat, S., Loree, T., Zemer, J., Tapia, J. L., Frustino, J., Kramer, J. M., Sinha, S., & Romano, R. A. (2023). High-Resolution Transcriptomic Landscape of the Human Submandibular Gland. *Journal of Dental Research*, *102*(5), 525–535. <https://doi.org/10.1177/00220345221147908>
- Hosseini, Z. F., Nelson, D. A., Moskwa, N., Sfakis, L. M., Castracane, J., & Larsen, M. (2018). FGF2-dependent mesenchyme and laminin-111 are niche factors in salivary gland organoids. *Journal of Cell Science*, jcs.208728. <https://doi.org/10.1242/jcs.208728>
- Hsu, J. C., & Yamada, K. M. (2010). Salivary Gland Branching Morphogenesis—Recent Progress and Future Opportunities. *International Journal of Oral Science*, *2*(3), 117–126. <https://doi.org/10.4248/IJOS10042>
- Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS*, *10*(9), 1886–1890. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>
- Ingber, D. E. (2022). Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nature Reviews Genetics*, *23*(8), 467–491. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00466-9>

- Ishida-Ishihara, S., Akiyama, M., Furusawa, K., Naguro, I., Ryuno, H., Sushida, T., Ishihara, S., & Haga, H. (2020). Osmotic gradient induces stable dome morphogenesis on extracellular matrix. *Journal of Cell Science*, jcs.243865. <https://doi.org/10.1242/jcs.243865>
- Ivanov, D. P., & Grabowska, A. M. (2017). Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. *Scientific Reports*, 7(1), 41160. <https://doi.org/10.1038/srep41160>
- Jang, S. I., Ong, H. L., Gallo, A., Liu, X., Illei, G., & Alevizos, I. (2015). Establishment of Functional Acinar-like Cultures from Human Salivary Glands. *Journal of Dental Research*, 94(2), Article 2. <https://doi.org/10.1177/0022034514559251>
- Jeong, J., Baek, H., Kim, Y.-J., Choi, Y., Lee, H., Lee, E., Kim, E. S., Hah, J. H., Kwon, T.-K., Choi, I. J., & Kwon, H. (2013). Human salivary gland stem cells ameliorate hyposalivation of radiation-damaged rat salivary glands. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.121>
- Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J., & Atala, A. (2007). In-vitro reconstitution of three-dimensional human salivary gland tissue structures. *Differentiation*, 75(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00138.x>
- Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J. J., & Atala, A. (2005). Tissue Engineering of Functional Salivary Gland Tissue: *The Laryngoscope*, 115(2), Article 2. <https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000154726.77915.cc>
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (1996). *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie* (Vierte, korrigierte und aktualisierte Auflage). Springer Berlin Heidelberg : Imprint : Springer.
- Kadoya, Y., Futaki, S., Shimono, C., Kimura, T., & Sekiguchi, K. (2022). Dynamics, structure and assembly of the basement membrane in developing salivary glands revealed by an exogenous EGFP-tagged nidogen probe. *Microscopy*, 71(6), 357–363. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfac040>
- Kadoya, Y., Kadoya, K., Durbeej, M., Holmvall, K., Sorokin, L., & Ekblom, P. (1995). Antibodies against domain E3 of laminin-1 and integrin alpha 6 subunit perturb branching epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes. *The Journal of Cell Biology*, 129(2), 521–534. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.2.521>
- Kadoya, Y., Mochizuki, M., Nomizu, M., Sorokin, L., & Yamashina, S. (2003). Role for laminin- α 5 chain LG4 module in epithelial branching morphogenesis. *Developmental Biology*, 263(1), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00446-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00446-9)
- Kadoya, Y., Salmivirta, K., Talts, J. F., Kadoya, K., Mayer, U., Timpl, R., & Ekblom, P. (1997). Importance of nidogen binding to laminin γ 1 for branching epithelial morphogenesis of the

- submandibular gland. *Development*, 124(3), 683–691.
<https://doi.org/10.1242/dev.124.3.683>
- Kajahn, J., Gorjup, E., Tiede, S., Von Briesen, H., Paus, R., Kruse, C., & Danner, S. (2008). Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *European Journal of Cell Biology*, 87(1), 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.07.004>
- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kashimata, M., & Gresik, E. W. (1997). Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular gland and regulates expression of the alpha6-integrin subunit. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 208(2), 149–161. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199702\)208:2<149::AID-AJA2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199702)208:2<149::AID-AJA2>3.0.CO;2-I)
- Kashimata, M., & Hayashi, T. (2018). Regulatory mechanisms of branching morphogenesis in mouse submandibular gland rudiments. *Japanese Dental Science Review*, 54(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.06.002>
- Kaspi, A., & Ziemann, M. (2020). mitch: Multi-contrast pathway enrichment for multi-omics and single-cell profiling data. *BMC Genomics*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06856-9>
- Kozlowski, M. T., Crook, C. J., & Ku, H. T. (2021). Towards organoid culture without Matrigel. *Communications Biology*, 4(1), 1387. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02910-8>
- Kruse, C., Birth, M., Rohwedel, J., Assmuth, K., Goepel, A., & Wedel, T. (2004). Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics A*, 79(7), 1617–1624. <https://doi.org/10.1007/s00339-004-2816-6>
- Kruse, C., & Fuhr, G. R. (2007). *Multizelluläre Testsysteme* (Patent 102004025080).
- Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W., & Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W90–W97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>
- Kusakabe, M., Sakakura, T., Sano, M., & Nishizuka, Y. (1985). A pituitary-salivary mixed gland induced by tissue recombination of embryonic pituitary epithelium and embryonic submandibular gland mesenchyme in mice. *Developmental Biology*, 110(2), 382–391. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90097-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90097-1)

- Lafrenie, R. M., & Yamada, K. M. (1998). Integrins and Matrix Molecules in Salivary Gland Cell Adhesion, Signaling, and Gene Expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 842(1), 42–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09630.x>
- Langhe, R. P., Gudzenko, T., Bachmann, M., Becker, S. F., Gonnermann, C., Winter, C., Abbruzzese, G., Alfandari, D., Kratzer, M.-C., Franz, C. M., & Kashef, J. (2016). Cadherin-11 localizes to focal adhesions and promotes cell–substrate adhesion. *Nature Communications*, 7(1), 10909. <https://doi.org/10.1038/ncomms10909>
- Larsen, M., Wei, C., & Yamada, K. M. (2006). Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis. *Journal of Cell Science*, 119(16), 3376–3384. <https://doi.org/10.1242/jcs.03079>
- Leask, A., Holmes, A. & Abraham, D.J. (2002). Connective tissue growth factor: A new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 4, 136–142. <https://doi.org/10.1007/s11926-002-0009-x>
- Lee, H. J., Nam, S. H., Son, K. J., & Koh, W.-G. (2010). Micropatterned Fibrous Scaffolds Fabricated Using Electrospinning and Hydrogel Lithography: New Platforms to Create Cellular Micropatterns. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 148(2), 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.032>
- Lenarz, T., & Boenninghaus, H.-G. (2012). *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-21131-7>
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), 585–595. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90662-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90662-X)
- Leung, B. M., Leshner-Perez, S. C., Matsuoka, T., Moraes, C., & Takayama, S. (2015). Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomaterials Science*, 3(2), 336–344. <https://doi.org/10.1039/C4BM00319E>
- Li, D., March, M. E., Fortugno, P., Cox, L. L., Matsuoka, L. S., Monetta, R., Seiler, C., Pyle, L. C., Bedoukian, E. C., Sánchez-Soler, M. J., Caluseriu, O., Grand, K., Tam, A., Aycinena, A. R. P., Camerota, L., Guo, Y., Sleiman, P., Callewaert, B., Kumps, C., ... Bhoj, E. J. (2021). Pathogenic variants in CDH11 impair cell adhesion and cause Teebi hypertelorism syndrome. *Human Genetics*, 140(7), 1061–1076. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02274-3>
- Li, W., Wang, X., Zhang, Q., Wang, H., Zuo, W., Xie, H., Tang, J., Wang, M., Zeng, Z., Cai, W., Tang, D., & Dai, Y. (2021). Quantitative ubiquitylomics reveals the ubiquitination regulation landscape in oral adenoid cystic carcinoma. *Bioscience Reports*, 41(8), BSR20211532. <https://doi.org/10.1042/BSR20211532>

- Lin, Y., Zhang, S., Rehn, M., Itäranta, P., Tuukkanen, J., Heljäsvaara, R., Peltoketo, H., Pihlajaniemi, T., & Vainio, S. (2001). Induced repatterning of type XVIII collagen expression in ureter bud from kidney to lung type: Association with sonic hedgehog and ectopic surfactant protein C. *Development*, *128*(9), 1573–1585. <https://doi.org/10.1242/dev.128.9.1573>
- Liu, X., Zhao, J., Xue, L., Zhao, T., Ding, W., Han, Y., & Ye, H. (2022). A comparison of transcriptome analysis methods with reference genome. *BMC Genomics*, *23*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08465-0>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lombaert, I. M. A., Abrams, S. R., Li, L., Eswarakumar, V. P., Sethi, A. J., Witt, R. L., & Hoffman, M. P. (2013). Combined KIT and FGFR2b Signaling Regulates Epithelial Progenitor Expansion during Organogenesis. *Stem Cell Reports*, *1*(6), 604–619. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.10.013>
- Lombaert, I. M. A., Brunsting, J. F., Wierenga, P. K., Faber, H., Stokman, M. A., Kok, T., Visser, W. H., Kampinga, H. H., de Haan, G., & Coppes, R. P. (2008). Rescue of Salivary Gland Function after Stem Cell Transplantation in Irradiated Glands. *PLoS ONE*, *3*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002063>
- Martin, L. E., Gutierrez, V. A., & Torregrossa, A.-M. (2023). The role of saliva in taste and food intake. *Physiology & Behavior*, *262*, 114109. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114109>
- Martinez-Madrigal, F., & Micheau, C. (1989). Histology of the Major Salivary Glands: *The American Journal of Surgical Pathology*, *13*(10), 879–899. <https://doi.org/10.1097/00000478-198910000-00008>
- Mattingly, A., Finley, J. K., & Knox, S. M. (2015). Salivary gland development and disease. *WIREs Developmental Biology*, *4*(6), 573–590. <https://doi.org/10.1002/wdev.194>
- Mauduit, O., Aure, M. H., Delcroix, V., Basova, L., Srivastava, A., Umazume, T., Mays, J. W., Bellusci, S., Tucker, A. S., Hajihosseini, M. K., Hoffman, M. P., & Makarenkova, H. P. (2022). A mesenchymal to epithelial switch in Fgf10 expression specifies an evolutionary-conserved population of ionocytes in salivary glands. *Cell Reports*, *39*(2), 110663. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110663>
- May, A. J., Cruz-Pacheco, N., Emmerson, E., Gaylord, E. A., Seidel, K., Nathan, S., Muench, M. O., Klein, O., & Knox, S. M. (2018). Diverse progenitor cells preserve salivary gland ductal architecture after radiation induced damage. *Development*, dev.166363. <https://doi.org/10.1242/dev.166363>

- Merrell, A. J., & Stanger, B. Z. (2016). Adult cell plasticity in vivo: De-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(7), 413–425. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.24>
- Molina, C. (2006). Basal lamina disorganisation of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome: Association with mononuclear cell infiltration. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *65*(2), 178–183. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.033837>
- Musich, R., Cadle-Davidson, L., & Osier, M. V. (2021). Comparison of Short-Read Sequence Aligners Indicates Strengths and Weaknesses for Biologists to Consider. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 657240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.657240>
- Nakamoto, T., Srivastava, A., Romanenko, V. G., Ovitt, C. E., Perez-Cornejo, P., Arreola, J., Begenisich, T., & Melvin, J. E. (2007). Functional and molecular characterization of the fluid secretion mechanism in human parotid acinar cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *292*(6), R2380–R2390. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00591.2006>
- Nakamura, R., Nakamura, F., & Fukunaga, S. (2014). Perlecan Diversely Regulates the Migration and Proliferation of Distinct Cell Types in vitro. *Cells Tissues Organs*, *200*(6), 374–393. <https://doi.org/10.1159/000440950>
- Nakanishi, Y., & Ishii, T. (1989). Epithelial shape change in mouse embryonic submandibular gland: Modulation by extracellular matrix components. *BioEssays*, *11*(6), 163–167. <https://doi.org/10.1002/bies.950110602>
- Nakanishi, Y., Nogawa, H., Hashimoto, Y., Kishi, J.-I., & Hayakawa, T. (1988). Accumulation of collagen III at the cleft points of developing mouse submandibular epithelium. *Development*, *104*(1), 51–59. <https://doi.org/10.1242/dev.104.1.51>
- Nakanishi, Y., Sugiura, F., Kishi, J.-I., & Hayakawa, T. (1986). Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland. *Developmental Biology*, *113*(1), 201–206. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90122-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90122-3)
- Naomi, R., Ridzuan, P. M., & Bahari, H. (2021). Current Insights into Collagen Type I. *Polymers*, *13*(16), 2642. <https://doi.org/10.3390/polym13162642>
- Nelson, D. A., Kazanjian, I., Melendez, J. A., & Larsen, M. (2024). Senescence and fibrosis in salivary gland aging and disease. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *14*(3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2024.02.009>
- Neyraud, E. (2014). Role of Saliva in Oral Food Perception. In A. J. M. Ligtenberg & E. C. I. Veerman (Hrsg.), *Monographs in Oral Science* (Bd. 24, S. 61–70). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000358789>

- Ogle, O. E. (2020). Salivary Gland Diseases. *Dental Clinics of North America*, 64(1), 87–104. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.08.007>
- Onodera, T., Sakai, T., Hsu, J. C., Matsumoto, K., Chiorini, J. A., & Yamada, K. M. (2010). Btbd7 Regulates Epithelial Cell Dynamics and Branching Morphogenesis. *Science*, 329(5991), Article 5991. <https://doi.org/10.1126/science.1191880>
- Ouyang, L., Yao, R., Mao, S., Chen, X., Na, J., & Sun, W. (2015). Three-dimensional bioprinting of embryonic stem cells directs highly uniform embryoid body formation. *Biofabrication*, 7(4), 044101. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/044101>
- Overeem, A. W., Bryant, D. M., & Van IJzendoorn, S. C. D. (2015). Mechanisms of apical–basal axis orientation and epithelial lumen positioning. *Trends in Cell Biology*, 25(8), 476–485. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.04.002>
- Owen, D. G., & Jordan, C. C. (1981). A modified amylase assay, using a fluorescent substrate, and its application to a study of the rat parotid gland in vitro. *Journal of Pharmacological Methods*, 6(4), 281–293. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(81\)90068-1](https://doi.org/10.1016/0160-5402(81)90068-1)
- Ozdemir, T., Srinivasan, P. P., Zakheim, D. R., Harrington, D. A., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C., Jia, X., & Pradhan-Bhatt, S. (2017). Bottom-up assembly of salivary gland microtissues for assessing myoepithelial cell function. *Biomaterials*, 142, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.022>
- Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3861–3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>
- Panzer, J. (2023). *Untersuchung des Einflusses dreidimensionaler Kultivierung auf Neuronen und Schweißdrüsenzellen mit Fokus auf elektrophysiologischer Funktionalität* [Inauguraldissertation]. Universität zu Lübeck.
- Patel, V. N., Knox, S. M., Likar, K. M., Lathrop, C. A., Hossain, R., Eftekhari, S., Whitelock, J. M., Elkin, M., Vlodaysky, I., & Hoffman, M. P. (2007). Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF10 activity during ex vivo submandibular gland branching morphogenesis. *Development*, 134(23), 4177–4186. <https://doi.org/10.1242/dev.011171>
- Patel, V. N., Likar, K. M., Zisman-Rozen, S., Cowherd, S. N., Lassiter, K. S., Sher, I., Yates, E. A., Turnbull, J. E., Ron, D., & Hoffman, M. P. (2008). Specific Heparan Sulfate Structures Modulate FGF10-mediated Submandibular Gland Epithelial Morphogenesis and Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9308–9317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709995200>
- Pedersen, A., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8(3), 117–129. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x>

- Pedersen, A. M. L., Sørensen, C. E., Proctor, G. B., Carpenter, G. H., & Ekström, J. (2018). Salivary secretion in health and disease. *Journal of Oral Rehabilitation*, *45*(9), 730–746. <https://doi.org/10.1111/joor.12664>
- Peng, J., Lu, G., Xue, H., Wang, T., & Shang, X. (2019). TS-GOEA: A web tool for tissue-specific gene set enrichment analysis based on gene ontology. *BMC Bioinformatics*, *20*(S18), Article S18. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3125-6>
- Pérez-Sayáns, M., Chamorro-Petronacci, C. M., Baltazar, F., Pires, F. R., Ínsua, Á., Suárez-Quintanilla, J. A., & Suárez-Peñaranda, J. M. (2021). Nestin Expression Is Associated with Relapses in Head and Neck Lesions. *Diagnostics*, *11*(4), 583. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11040583>
- Petschnik, A. E. (2011). *Xenogene Kokultur zur Induktion der neuronalen Differenzierung in humanen glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen*. Universität zu Lübeck.
- Pierfelice, T. V., D'Amico, E., Petrini, M., Romano, M., D'Arcangelo, C., Sbordone, L., Barone, A., Plebani, R., & Iezzi, G. (2024). A Systematic Review on Organ-on-a-Chip in PDMS or Hydrogel in Dentistry: An Update of the Literature. *Gels*, *10*(2), 102. <https://doi.org/10.3390/gels10020102>
- Porcheri, C., & Mitsiadis, T. (2019). Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. *Cells*, *8*(9), 976. <https://doi.org/10.3390/cells8090976>
- Pou Casellas, C., Pleguezuelos-Manzano, C., Rookmaaker, M. B., Verhaar, M. C., & Clevers, H. (2023). Transcriptomic profile comparison reveals conservation of ionocytes across multiple organs. *Scientific Reports*, *13*(1), 3516. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30603-1>
- Pozzi, A., Yurchenco, P. D., & Iozzo, R. V. (2017). The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biology*, *57–58*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.12.009>
- Pradhan, S., Zhang, C., Jia, X., Carson, D. D., Witt, R., & Farach-Carson, M. C. (2009). Perlecan Domain IV Peptide Stimulates Salivary Gland Cell Assembly *In Vitro*. *Tissue Engineering Part A*, *15*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0669>
- Pradhan-Bhatt, S., Harrington, D. A., Duncan, R. L., Jia, X., Witt, R. L., & Farach-Carson, M. C. (2013). Implantable Three-Dimensional Salivary Spheroid Assemblies Demonstrate Fluid and Protein Secretory Responses to Neurotransmitters. *Tissue Engineering Part A*, *19*(13–14), Article 13–14. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0301>
- Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, *70*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/prd.12116>
- Rapoport, D. H., Schick Tanz, S., Gürleyik, E., Zühlke, C., & Kruse, C. (2009). Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells. *Annals of*

- Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 191(5), 446–458.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2009.07.002>
- Rebustini, I. T., Myers, C., Lassiter, K. S., Surmak, A., Szabova, L., Holmbeck, K., Pedchenko, V., Hudson, B. G., & Hoffman, M. P. (2009). MT2-MMP-Dependent Release of Collagen IV NC1 Domains Regulates Submandibular Gland Branching Morphogenesis. *Developmental Cell*, 17(4), 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.07.016>
- Rebustini, I. T., Patel, V. N., Stewart, J. S., Layvey, A., Georges-Labouesse, E., Miner, J. H., & Hoffman, M. P. (2007). Laminin $\alpha 5$ is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through $\beta 1$ integrin signaling. *Developmental Biology*, 308(1), 15–29. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.04.031>
- Reiß, M. (Hrsg.). (2021). *Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58178-0>
- Richter, A., Nissen, N., Mailänder, P., Stang, F., Siemers, F., Kruse, C., & Danner, S. (2013). Mammary gland-derived nestin-positive cell populations can be isolated from human male and female donors. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(4), Article 4. <https://doi.org/10.1186/scrt229>
- Rinta-Jaskari, M. M., Naillat, F., Ruotsalainen, H. J., Koivunen, J. T., Sasaki, T., Pietilä, I., Elamaa, H. P., Kaur, I., Manninen, A., Vainio, S. J., & Pihlajaniemi, T. A. (2023). Temporally and spatially regulated collagen XVIII isoforms are involved in ureteric tree development via the TSP1-like domain. *Matrix Biology*, 115, 139–159. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2023.01.001>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- Robyt, J. F. (2008). *Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology*.
- Rocchi, C., Barazzuol, L., & Coppes, R. P. (2021). The evolving definition of salivary gland stem cells. *Npj Regenerative Medicine*, 6(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00115-x>
- Rose, S. C., Larsen, M., Xie, Y., & Sharfstein, S. T. (2023). Salivary Gland Bioengineering. *Bioengineering*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11010028>
- Rotter, N., Oder, J., Schlenke, P., Lindner, U., Böhrnsen, F., Kramer, J., Rohwedel, J., Huss, R., Brandau, S., Wollenberg, B., & Lang, S. (2008). Isolation and Characterization of Adult

- Stem Cells from Human Salivary Glands. *Stem Cells and Development*, 17(3), Article 3. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0180>
- Ruoslahti, E., & Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 64(5), 867–869. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90308-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90308-L)
- Sachstand zu Tierversuchen und tierversuchsfreien Alternativmethoden* (Sachstand WD 8-3000-087/20, WD 5-3000-131/20, WD 9-3000-105/20). (2020). Wissenschaftlichen Dienste des Deutschen Bundestages.
- Saitou, M., Gaylord, E. A., Xu, E., May, A. J., Neznanova, L., Nathan, S., Grawe, A., Chang, J., Ryan, W., Ruhl, S., Knox, S. M., & Gokcumen, O. (2020). Functional Specialization of Human Salivary Glands and Origins of Proteins Intrinsic to Human Saliva. *Cell Reports*, 33(7), 108402. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108402>
- Sakai, T., Larsen, M., & Yamada, K. M. (2003). Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*, 423(6942), 876–881. <https://doi.org/10.1038/nature01712>
- Sato, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T., Yura, Y., & Nitta, T. (1984). Search for specific markers of neoplastic epithelial duct and myoepithelial cell lines established from human salivary gland and characterization of their growth in vitro. *Cancer*, 54(12), 2959–2967. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19841215\)54:12<2959::AID-CNCR2820541225>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19841215)54:12<2959::AID-CNCR2820541225>3.0.CO;2-5)
- Schramm, R., Koslow, M., Nelson, D., Larsen, M., & Castracane, J. (2017). A Novel Impedance Biosensor for Measurement of Trans-Epithelial Resistance in Cells Cultured on Nanofiber Scaffolds. *Biosensors*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/bios7030035>
- Scott, J., Flower, E. A., & Burns, J. (1987). A quantitative study of histological changes in the human parotid gland occurring with adult age. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 16(10), 505–510. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1987.tb00681.x>
- Sequeira, S. J., Larsen, M., & DeVine, T. (2010). Extracellular Matrix and Growth Factors in Salivary Gland Development. In A. S. Tucker & I. Miletich (Hrsg.), *Frontiers of Oral Biology* (Bd. 14, S. 48–77). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000313707>
- Sequeira, S. J., Soscia, D. A., Oztan, B., Mosier, A. P., Jean-Gilles, R., Gadre, A., Cady, N. C., Yener, B., Castracane, J., & Larsen, M. (2012). The regulation of focal adhesion complex formation and salivary gland epithelial cell organization by nanofibrous PLGA scaffolds. *Biomaterials*, 33(11), 3175–3186. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.010>
- Shin, H.-S., Hong, H. J., Koh, W.-G., & Lim, J.-Y. (2018). Organotypic 3D Culture in Nanoscaffold Microwells Supports Salivary Gland Stem-Cell-Based Organization. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(12), Article 12. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00894>

- Shin, H.-S., Kook, Y.-M., Hong, H. J., Kim, Y.-M., Koh, W.-G., & Lim, J.-Y. (2016). Functional spheroid organization of human salivary gland cells cultured on hydrogel-micropatterned nanofibrous microwells. *Acta Biomaterialia*, *45*, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.058>
- Shin, H.-S., Lee, S., Hong, H. J., Lim, Y. C., Koh, W.-G., & Lim, J.-Y. (2018). Stem cell properties of human clonal salivary gland stem cells are enhanced by three-dimensional priming culture in nanofibrous microwells. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0829-x>
- Song, Y., Uchida, H., Sharipol, A., Piraino, L., Mereness, J. A., Ingalls, M. H., Rebhahn, J., Newlands, S. D., DeLouise, L. A., Ovitt, C. E., & Benoit, D. S. W. (2021). Development of a functional salivary gland tissue chip with potential for high-content drug screening. *Communications Biology*, *4*(1), 361. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01876-x>
- Soscia, D. A., Sequeira, S. J., Schramm, R. A., Jayarathanam, K., Cantara, S. I., Larsen, M., & Castracane, J. (2013). Salivary gland cell differentiation and organization on micropatterned PLGA nanofiber craters. *Biomaterials*, *34*(28), Article 28. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.061>
- Srinivasan, P. P., Patel, V. N., Liu, S., Harrington, D. A., Hoffman, M. P., Jia, X., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C., & Pradhan-Bhatt, S. (2017). Primary Salivary Human Stem/Progenitor Cells Undergo Microenvironment-Driven Acinar-Like Differentiation in Hyaluronate Hydrogel Culture: Differentiation of Salivary Stem/Progenitor Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*, *6*(1), Article 1. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0083>
- Steinberg, Z., Myers, C., Heim, V. M., Lathrop, C. A., Rebutini, I. T., Stewart, J. S., Larsen, M., & Hoffman, M. P. (2005). FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development*, *132*(6), 1223–1234. <https://doi.org/10.1242/dev.01690>
- Sui, Y., Zhang, S., Li, Y., Zhang, X., Hu, W., Feng, Y., Xiong, J., Zhang, Y., & Wei, S. (2020). Generation of functional salivary gland tissue from human submandibular gland stem/progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01628-4>
- Szlávik, V., Szabó, B., Vicsek, T., Barabás, J., Bogdán, S., Gresz, V., Varga, G., O'Connell, B., & Vág, J. (2008). Differentiation of Primary Human Submandibular Gland Cells Cultured on Basement Membrane Extract. *Tissue Engineering Part A*, *14*(11), 1915–1926. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0208>
- Tan, E. C. K., Lexomboon, D., Sandborgh-Englund, G., Haasum, Y., & Johnell, K. (2018). Medications That Cause Dry Mouth As an Adverse Effect in Older People: A Systematic

- Review and Metaanalysis. *Journal of the American Geriatrics Society*, 66(1), 76–84. <https://doi.org/10.1111/jgs.15151>
- Tanaka, J., & Mishima, K. (2020). *In vitro* three-dimensional culture systems of salivary glands. *Pathology International*, 70(8), Article 8. <https://doi.org/10.1111/pin.12947>
- Tanaka, J., Ogawa, M., Hojo, H., Kawashima, Y., Mabuchi, Y., Hata, K., Nakamura, S., Yasuhara, R., Takamatsu, K., Irié, T., Fukada, T., Sakai, T., Inoue, T., Nishimura, R., Ohara, O., Saito, I., Ohba, S., Tsuji, T., & Mishima, K. (2018). Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06469-7>
- Teresa Buck. (2022). *Physiologische Charakterisierung der intrazellulären Calcium-Signaltransduktion in Ex-vivo-Schweißdrüsen des Menschen und der Ratte* [Inauguraldissertation]. Universität zu Lübeck.
- The Gene Ontology Consortium, Aleksander, S. A., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J. M., Drabkin, H. J., Ebert, D., Feuermann, M., Gaudet, P., Harris, N. L., Hill, D. P., Lee, R., Mi, H., Moxon, S., Mungall, C. J., Muruganugan, A., Mushayahama, T., Sternberg, P. W., Thomas, P. D., ... Westerfield, M. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *GENETICS*, 224(1), iyad031. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
- Tran, O. N., Wang, H., Li, S., Malakhov, A., Sun, Y., Abdul Azees, P. A., Gonzalez, A. O., Cao, B., Marinkovic, M., Singh, B. B., Dean, D. D., Yeh, C.-K., & Chen, X.-D. (2022). Organ-specific extracellular matrix directs trans-differentiation of mesenchymal stem cells and formation of salivary gland-like organoids in vivo. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02993-y>
- Tran, S. D., Wang, J., Bandyopadhyay, B. C., Redman, R. S., Dutra, A., Pak, E., Swaim, W. D., Gerstenhaber, J. A., Bryant, J. M., Zheng, C., Goldsmith, C. M., Kok, M. R., Wellner, R. B., & Baum, B. J. (2005). Primary Culture of Polarized Human Salivary Epithelial Cells for Use in Developing an Artificial Salivary Gland. *Tissue Engineering*, 11(1–2), Article 1–2. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.172>
- Tucker, A. S. (2007). Salivary gland development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(2), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.01.006>
- Turner, R. J., & Sugiya, H. (2002). Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Diseases*, 8(1), 3–11. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.10815.x>
- Valdez, I. H., & Fox, P. C. (1991). Interactions of the Salivary and Gastrointestinal Systems. *Digestive Diseases*, 9(3), 125–132. <https://doi.org/10.1159/000171298>
- Valstar, M. H., De Bakker, B. S., Steenbakkers, R. J. H. M., De Jong, K. H., Smit, L. A., Klein Nulent, T. J. W., Van Es, R. J. J., Hofland, I., De Keizer, B., Jasperse, B., Balm, A. J. M., Van Der Schaaf, A., Langendijk, J. A., Smeele, L. E., & Vogel, W. V. (2021). The tubarial salivary

- glands: A potential new organ at risk for radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 154, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.09.034>
- Vissink, A., Spijkervet, F. K. L., & Amerongen, A. V. N. (1996). Aging and saliva: A review of the literature. *Special Care in Dentistry*, 16(3), 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1754-4505.1996.tb00842.x>
- Wadman, M. (2023). FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science*, 379(6628), 127–128. <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>
- Wang, S., Matsumoto, K., Lish, S. R., Cartagena-Rivera, A. X., & Yamada, K. M. (2021). Budding epithelial morphogenesis driven by cell-matrix versus cell-cell adhesion. *Cell*, 184(14), Article 14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.015>
- Wang, X., & Eisbruch, A. (2016). IMRT for head and neck cancer: Reducing xerostomia and dysphagia. *Journal of Radiation Research*, 57(S1), i69–i75. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw047>
- Weiffenbach, J. M., Fox, P. C., & Baum, B. J. (1986). Taste and salivary function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(16), 6103–6106. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.6103>
- Weng, P.-L., Aure, M. H., Maruyama, T., & Ovitt, C. E. (2018). Limited Regeneration of Adult Salivary Glands after Severe Injury Involves Cellular Plasticity. *Cell Reports*, 24(6), 1464–1470.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.016>
- Weng, P.-L., Aure, M. H., & Ovitt, C. E. (2019). Concise Review: A Critical Evaluation of Criteria Used to Define Salivary Gland Stem Cells. *Stem Cells*, 37(9), 1144–1150. <https://doi.org/10.1002/stem.3046>
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V., Tarasova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R., & Wobus, A. M. (2004). Nestin expression ? A property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19–20), 2510–2522. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4144-6>
- Wu, R., & Sato, G. H. (1978). Replacement of serum in cell culture by hormones: A study of hormonal regulation of cell growth and specific gene expression. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 4(2–3), 427–448. <https://doi.org/10.1080/15287397809529669>
- Yamada, A., Futagi, M., Fukumoto, E., Saito, K., Yoshizaki, K., Ishikawa, M., Arakaki, M., Hino, R., Sugawara, Y., Ishikawa, M., Naruse, M., Miyazaki, K., Nakamura, T., & Fukumoto, S. (2016). Connexin 43 Is Necessary for Salivary Gland Branching Morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 291(2), Article 2. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.674663>

- Yanagawa, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yura, Y., & Sato, M. (1986). Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, *51*(1), 187–195. <https://doi.org/10.1007/BF02899028>
- Yanai, H., Sato, Y., Nagatsuka, H., & Yoshino, T. (2013). Nestin is a wide-spectrum abluminal cell marker of salivary gland tumors. *Pathology International*, *63*(10), 496–501. <https://doi.org/10.1111/pin.12103>
- Yi, T., Lee, S., Choi, N., Shin, H.-S., Kim, J., & Lim, J.-Y. (2016). Single Cell Clones Purified from Human Parotid Glands Display Features of Multipotent Epitheliomesenchymal Stem Cells. *Scientific Reports*, *6*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep36303>
- Yin, H., Pranzatelli, T. J. F., French, B. N., Zhang, N., Warner, B. M., Chiorini, J. A., & NIDCD/NIDCR Genomics and Computational Biology Core. (2021). Sclerosing Sialadenitis Is Associated With Salivary Gland Hypofunction and a Unique Gene Expression Profile in Sjögren's Syndrome. *Frontiers in Immunology*, *12*, 699722. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699722>
- Yin, M., Liu, X., Da, J., Yuan, H., Jin, H., Miao, N., Liu, L., Wang, A., Zhang, B., & Li, Y. (2022). The effect and mechanism of gene Fam20a on the development and function of salivary glands in mice. *Archives of Oral Biology*, *137*, 105367. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105367>
- Yin, Y., Vázquez-Rosado, E. J., Wu, D., Viswanathan, V., Farach, A., Farach-Carson, M. C., & Harrington, D. A. (2023). Microfluidic coaxial 3D bioprinting of cell-laden microfibers and microtubes for salivary gland tissue engineering. *Biomaterials Advances*, *154*, 213588. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213588>
- Yokoyama, M. (2017). Expression of a Neural Stem/Progenitor Cell Marker Nestin in Salivary Glands. *MOJ Anatomy & Physiology*, *4*(2), Article 2. <https://doi.org/10.15406/mojap.2017.04.00133>
- Yoon, Y.-J., Kim, D., Tak, K. Y., Hwang, S., Kim, J., Sim, N. S., Cho, J.-M., Choi, D., Ji, Y., Hur, J. K., Kim, H., Park, J.-E., & Lim, J.-Y. (2022). Salivary gland organoid culture maintains distinct glandular properties of murine and human major salivary glands. *Nature Communications*, *13*(1), 3291. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30934-z>
- Yu, W., Datta, A., Leroy, P., O'Brien, L. E., Mak, G., Jou, T.-S., Matlin, K. S., Mostov, K. E., & Zegers, M. M. P. (2005). B1-Integrin Orients Epithelial Polarity via Rac1 and Laminin. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(2), 433–445. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-05-0435>
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., & Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach

- to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, 6(1), 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
- Zhang, B.-X., Zhang, Z.-L., Lin, A. L., Wang, H., Pilia, M., Ong, J. L., Dean, D. D., Chen, X.-D., & Yeh, C.-K. (2015). Silk Fibroin Scaffolds Promote Formation of the *Ex Vivo* Niche for Salivary Gland Epithelial Cell Growth, Matrix Formation, and Retention of Differentiated Function. *Tissue Engineering Part A*, 21(9–10), 1611–1620. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0411>
- Zhang, G., Wang, X., & Zhang, Q. (2023). Cdh11: Roles in different diseases and potential value in disease diagnosis and treatment. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 36, 101576. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101576>
- Zhang, Y., Gorry, M. C., Post, J. C., & Ehrlich, G. D. (1999). Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene and comparative analysis of the human FGFR gene family. *Gene*, 230(1), 69–79. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00047-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00047-5)

Anhang

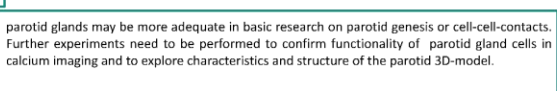
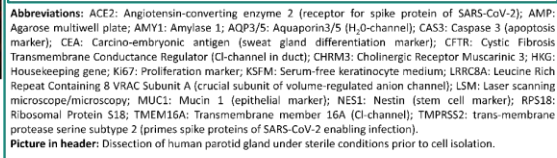
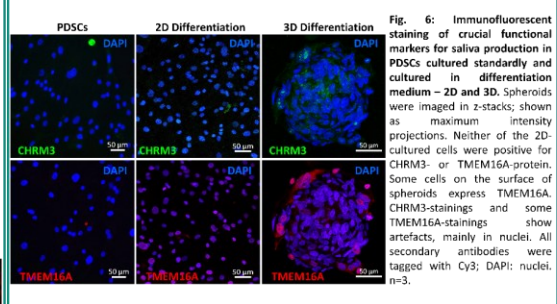
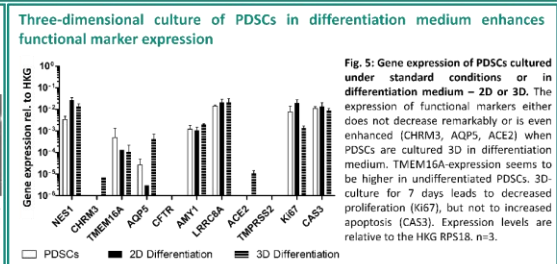
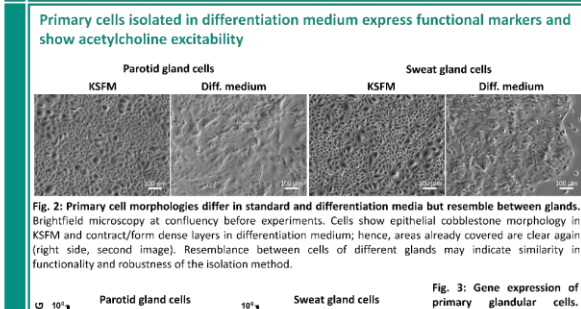
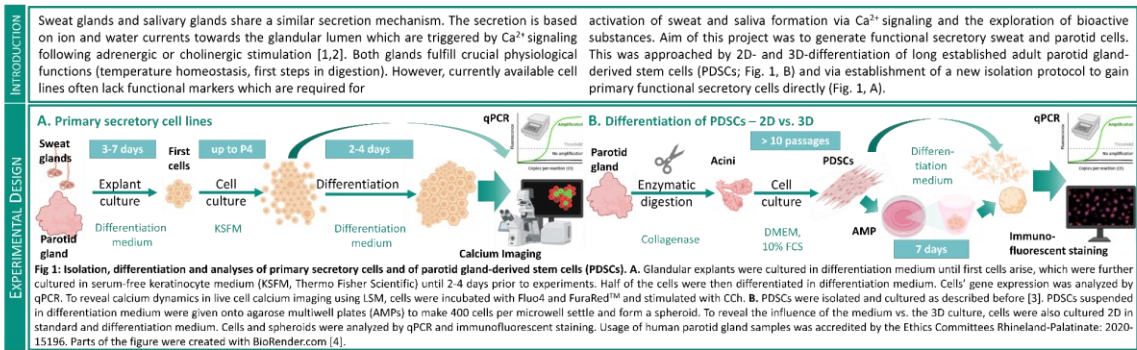
Poster zu epithelialen Drüsenzellen (TERMIS 2021)



Establishment of functional cell-based test systems of sweat glands and parotid glands

Leonie Hilger^{1*}, Teresa Buck¹, Anna E. Matthießen¹, Heiko Benzin^{1*}, Charli Kruse^{1*}, Jan Hagemann², Torsten Fauth³, Matthias Brandenburger¹

¹ Fraunhofer Research and Development Center for Marine and Cellular Biotechnology EMB, Lübeck, Germany; ² Institute of Medical and Marine Biotechnology, University of Lübeck, Germany; ³ University of Mainz, School of Medicine, Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Mainz, Germany; ³ BRAIN Biotech AG, Zwillingenberg, Germany



CONCLUSION
Both acquired glandular models show promising features that can be of interest for different applications: A secretory sweat gland cell line expressing CHRM3 and, in parotid glands cells also TMPRSS2, may be used in high-throughput screenings for bioactive substances (e.g. antiperspirants or TMPRSS2 inhibitors). Whereas, 3D-models of

parotid glands may be more adequate in basic research on parotid genesis or cell-cell-contacts. Further experiments need to be performed to confirm functionality of parotid gland cells in calcium imaging and to explore characteristics and structure of the parotid 3D-model.

Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern für sekretorische Marker

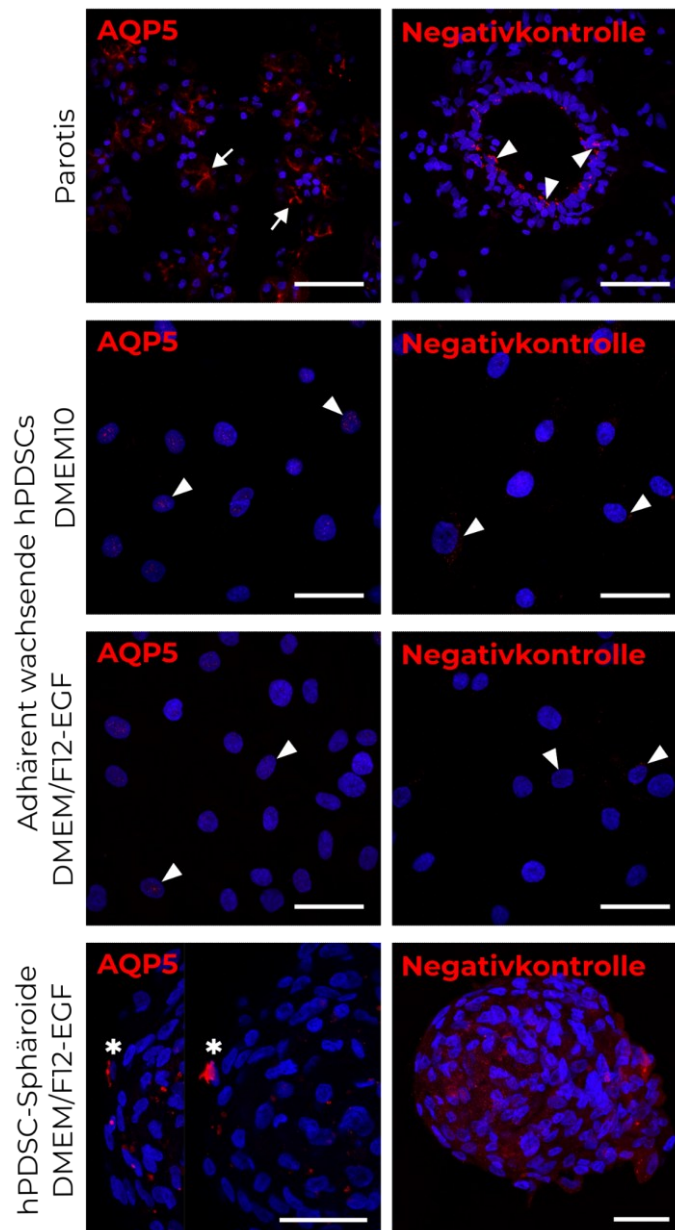


Abbildung A.1: Weder adhärent kultivierte hPDSCs noch hPDSC-Sphäroide zeigten sich in Immunfluoreszenzfärbungen eindeutig AQP5-positiv. Parotisschnitte (kryokonserviert, 12 μm), Antikörper sowie hPDSC-Sphäroide in DMEM/F12-EGF wurden mit monoklonalen Primärantikörpern für AQP5 (aus Maus IgG1) und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (aus Ziege gegen Maus) gefärbt (rot). Die Negativkontrolle bestand in einer Färbung mit nicht spezifischen IgG1-Antikörpern aus Maus statt des AQP5-Primärantikörpers. In der Parotis liegt AQP5 in der apikalen Membran der Azini, was in der Färbung zu erkennen war. Die Negativkontrolle auf Parotis zeigte mittelgroße Einschlüsse von Cy3 z. B. um den Nukleus einiger Gangzellen. In den adhärent wachsenden Zellen in beiden Medien waren keine AQP5-positiven Zellen zu finden, sondern nur Artefakte in Form von kleinen Einschlüssen im Nukleus oder Zytosol zu verzeichnen. In den hPDSC-Sphäroiden (untere Reihe, orthogonale Projektionen der Z-Stapel) fand sich sowohl in der Negativkontrolle als auch in der AQP5-Färbung ein Cy3-Signal, was darauf hindeutete, dass dieses unspezifisch war; Asterisk: einzige Zelle, die stärker als die Artefakte in der Negativkontrolle gefärbt zu sein scheint. Maßstabsbalken 50 μm .

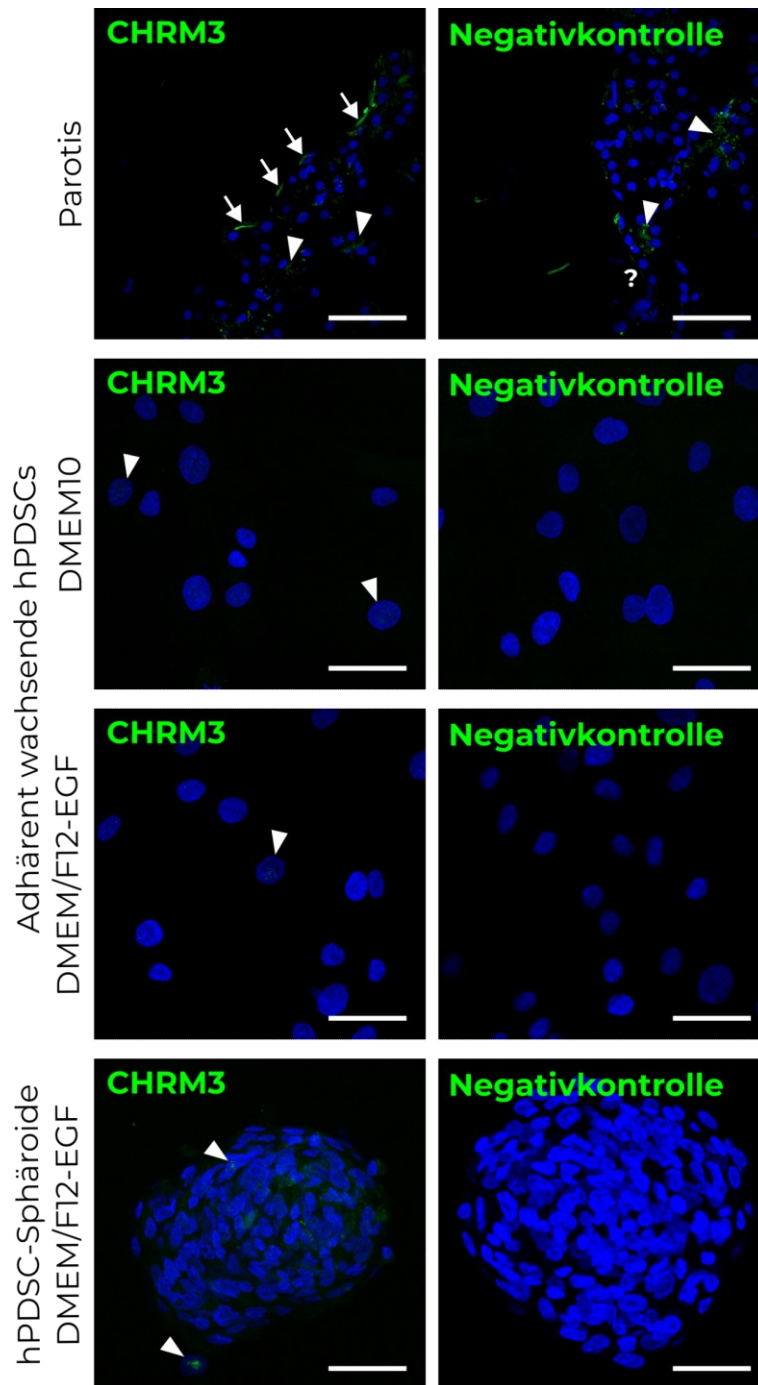


Abbildung A.2: Weder adhärenz noch in Sphäroiden kultivierte hPDSCs zeigten eine Immunfluoreszenzfärbung für CHRM3. Parotisschnitte (kryokonserviert, 12 μm), adhärenz wachsende hPDSCs sowie hPDSC-Sphäroide in DMEM/F12-EGF wurden mit polyklonalen Primärantikörpern für CHRM3 (aus Kaninchen) und FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern (aus Ziege gegen Kaninchen) gefärbt (grün). Die Negativkontrolle bestand in einer Färbung ohne den Primärantikörper. In der Parotis liegt CHRM3 vorwiegend in der basalen Membran azinärer Zellen, was in der Färbung der Parotisschnitte (oben) zu erkennen war. Die Negativkontrolle wies ebenso wie die CHRM3-Antikörperfärbung Artefakte in bzw. zwischen den Azini auf (Pfeilspitzen). In den adhärenz wachsenden Zellen in beiden Medien (mittlere Reihen) befanden sich unspezifische Färbungen in den Zellkernen (Pfeilspitzen). In hPDSC-Sphäroiden (unten; hier hPDSC2) waren ähnlich wie in den Parotisschnitten neben den punktuellen Artefakten im Zellkern auch Artefakte außerhalb der Zellkerne (Pfeilspitzen) sowie Rauschen im Innern der Sphäroide zu erkennen. Maßstabsbalken 50 μm .

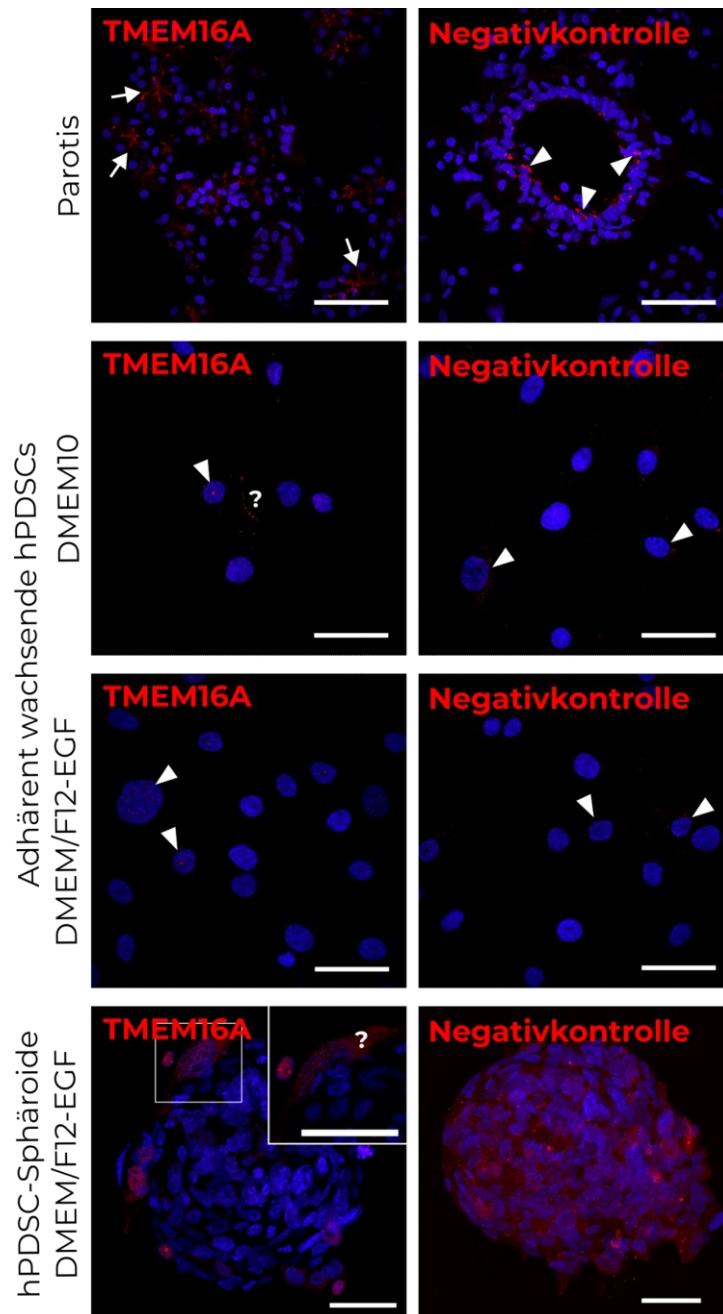


Abbildung A.3: Weder adhärenz kultivierte hPDSCs noch hPDSC-Sphäroide zeigten sich in Immunfluoreszenzfärbungen eindeutig TMEM16A-positiv. Parotisschnitte (kryokonserviert, 12 μm), adhärenz in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierte sowie hPDSC-Sphäroide in DMEM/F12-EGF wurden mit monoklonalen Primärantikörpern für TMEM16A (aus Maus IgG1) und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (aus Ziege gegen Maus) gefärbt (rot). Die Negativkontrolle bestand in einer Färbung mit nicht spezifischen IgG1-Antikörpern aus Maus statt des TMEM16A-Primärantikörpers. In der Parotis liegt TMEM16A in der apikalen Membran der Azini, was in der Färbung zu erkennen war (obere Reihe, Pfeile). Die Negativkontrolle auf Parotis zeigte mittelgroße Einschlüsse von Cy3 z. B. um den Nukleus einiger Gangzellen (obere Reihe, Pfeilspitzen). In den adhärenz wachsenden Zellen in beiden Medien (mittlere Reihen) waren keine TMEM16A-positiven Zellen zu finden, sondern nur Artefakte in Form von kleinen Einschlüssen im Nukleus oder Zytoplasma zu verzeichnen (Pfeilspitzen). In den hPDSC-Sphäroiden (untere Reihe) fand sich sowohl in der Negativkontrolle als auch in der TMEM16A-Färbung ein Cy3-Signal, was darauf hindeutet, dass dieses unspezifisch war. Die Fragezeichen markieren Zellen, die womöglich TMAM16A-positiv sein könnten. Maßstabsbalken 50 μm .

Zusätzliche Infos zur RNA-Seq-Auswertung

Tabelle A. 1: Experimentelles Design für differenzielle Genexpressionsanalyse mit edgeR in Omicsbox.

hPDSC: humane Parotis-abgeleitete Stammzellen (engl. *human parotid-derived stem cells*); 2D: adhärenz kultiviert; 3D: Sphäroidkultur; DMEM10: Standardmedium; DMEM/F12-EGF: epitheliales Differenzierungsmedium.

Probe	Kondition	Zelllinie
hPDSC1_2D-DMEM10	Stammzellen	hPDSC1
hPDSC1_2D-DMEMF12-EGF	differenziert durch Medium	hPDSC1
hPDSC1_3D-DMEMF12-EGF	differenziert durch Medium und 3D	hPDSC1
hPDSC3_2D-DMEM10	Stammzellen	hPDSC3
hPDSC3_2D-DMEMF12-EGF	differenziert durch Medium	hPDSC3
hPDSC3_3D-DMEMF12-EGF	differenziert durch Medium und 3D	hPDSC3
hPDSC4_2D-DMEM10	Stammzellen	hPDSC4
hPDSC4_2D-DMEMF12-EGF	differenziert durch Medium	hPDSC4
hPDSC4_3D-DMEMF12-EGF	differenziert durch Medium und 3D	hPDSC4

Tabelle A. 2: Die Mehrzahl der Gene, die Bestandteil adulter muriner EZM sind und die Differenzierung zu Speicheldrüsenzellen fördern, werden in hPDSC-Sphäroiden exprimiert oder sogar höher exprimiert als in adhärenter Kultur. Liste von EZM-Proteinen der SMG nach Tran et al. (1. Spalte) samt Expressionsdaten der hPDSC-Sphäroide (2. Spalte: durchschnittliche *counts* der 3D-DMEM/F12-EGF; n = 3) und der DEA-Ergebnisse aus 2D-DMEM10 vs. 2D-DMEM/F12-EGF (Vergleich: Medien) und 2D-DMEM/F12-EGF vs. 3D-DMEM/F12-EGF (Vergleich: 2D vs. 3D): Spalten und 4-7; der Unterschied bezieht sich immer auf die zuletzt genannte Kondition (z. B. AGRN, Medien: niedriger in 2D-DMEM/F12-EGF); FDR = *false discovery rate* (zu Deutsch Falscherkennungsrate), logFC = log (*fold change*) (zu Deutsch Logarithmus der x-fachen Änderung).

Genname	Ø counts in 3D	Vergleich	Unter- schied	logFC	p-Wert	FDR
AGRN	749	Medien	niedriger	-1,45	5,44E-07	5,57E-05
		2D vs. 3D	höher	1,0758	1,65E-07	4,77E-06
ANXA2	4544	Medien	-	0,81	0,002	0,009
		2D vs. 3D	niedriger	-1,5205	1,45E-09	1,58E-07
ASPN		Medien	-			
		2D vs. 3D	-			
BGN	5736	Medien	-	-0,28	0,14	0,24
		2D vs. 3D	höher	1,3766	1,45E-07	4,32E-06
CALR	8504	Medien	-	0,66	6,00E-02	1,30E-01
		2D vs. 3D	-	-0,2601	1,70E-02	4,87E-02
CASK	280	Medien	-	0,03	8,86E-01	9,10E-01
		2D vs. 3D	-	0,1246	2,53E-01	3,84E-01
COL18A1	131	Medien	-	1,26	3,00E-02	8,00E-02
		2D vs. 3D	höher	2,373	2,45E-08	1,19E-06
COL1A1	88329	Medien	-	-0,83	3,00E-03	1,50E-02
		2D vs. 3D	-	-0,1342	5,29E-01	6,58E-01
COL22A1	58	Medien	-	1,95	2,00E-02	6,00E-02
		2D vs. 3D	-	-0,6757	4,38E-01	5,76E-01
COL2A1	0	Medien	-			
		2D vs. 3D	-			
COL3A1	4449	Medien	-	-0,67	0,004	0,016
		2D vs. 3D	höher	1,2887	1,87E-03	8,52E-03
COL4A1	9523	Medien	-	-0,71	2,20E-01	3,36E-01
		2D vs. 3D	höher	3,0033	3,18E-12	2,55E-09
COL4A2	8736	Medien	-	-0,82	4,30E-02	1,40E-02
		2D vs. 3D	höher	2,7213	1,35E-10	2,83E-08
COL4A3	0	Medien	-			
		2D vs. 3D	-			
COL4A4	27	Medien	-			
		2D vs. 3D	-	0,8611	4,52E-02	1,03E-01

Genname	Ø counts in 3D	Vergleich	Unter- schied	logFC	p-Wert	FDR
COL4A5	143	Medien	höher	2,435	3,95E-06	1,92E-04
		2D vs. 3D	-	-0,397	3,52E-02	8,55E-02
COL4A6	23	Medien	-			
		2D vs. 3D	-	0,9714	1,92E-02	5,37E-02
COL5A1	4784	Medien	-	-0,645	3,00E-03	1,40E-02
		2D vs. 3D	-	-0,1348	4,95E-01	6,28E-01
COL5A2	5840	Medien	-	0,189	7,40E-02	5,01E-01
		2D vs. 3D	-	-0,0584	7,95E-01	8,66E-01
COL5A3	2281	Medien	-	0,067	6,97E-01	7,84E-01
		2D vs. 3D	-	0,9009	5,31E-07	1,18E-05
COL6A1	46032	Medien	-	0,105	4,14E-01	5,40E-01
		2D vs. 3D	höher	1,0924	1,19E-07	3,77E-06
COL6A2	33248	Medien	-	-0,068	5,82E-01	6,92E-01
		2D vs. 3D	höher	1,0785	1,23E-07	3,86E-06
DAG1	461	Medien	-	-0,943	2,02E-05	4,78E-04
		2D vs. 3D	-	-0,1505	1,63E-01	2,76E-01
DCN	18924	Medien	-	0,253	2,77E-01	3,99E-01
		2D vs. 3D	höher	1,3927	1,29E-07	4,01E-06
DPT	422	Medien	-	0,033	9,71E-01	9,81E-01
		2D vs. 3D	höher	4,4881	7,54E-09	4,80E-07
FBN1	12181	Medien	-	-0,404	1,20E-02	3,90E-02
		2D vs. 3D	niedriger	-1,3194	6,69E-08	2,53E-06
FN1	309458	Medien	-	-0,11	0,63	0,742
		2D vs. 3D	höher	1,83	0,003	0,015
GJA1	1326	Medien	höher	1,03	0,002	0,012
		2D vs. 3D	höher	1,22	1,18E-05	1,46E-04
HSPG2	7067	Medien	niedriger	-2,58	2,23E-04	1,49E-04
		2D vs. 3D	-	0,19	0,11	0,21
ITGA6	5	Medien	niedriger	-2,632	2,23E-04	2,00E-03
		2D vs. 3D	-	-1,5585	7,83E-02	1,58E-01
LAMA1	575	Medien	höher	1,35	9,03E-06	2,95E-04
		2D vs. 3D	höher	1,33	9,99E-06	1,28E-04
LAMA2	7764	Medien	höher	1,225	2,54E-05	5,64E-04
		2D vs. 3D	höher	1,7104	1,72E-09	1,68E-07
LAMA4	1606	Medien	-	0,491	9,05E-04	6,00E-03
		2D vs. 3D	-	0,3335	1,77E-02	5,02E-02
LAMA5	75	Medien	höher	1,744	6,88E-04	5,00E-03

Genname	Ø counts in 3D	Vergleich	Unter- schied	logFC	p-Wert	FDR
		2D vs. 3D	niedriger	-2,0747	1,74E-04	1,27E-03
LAMB1	14107	Medien	höher	1,256	9,53E-06	3,07E-04
		2D vs. 3D	höher	1,7523	2,73E-09	2,39E-07
LAMB2	1981	Medien	-	-0,639	3,49E-04	3,00E-03
		2D vs. 3D	-	-0,6627	3,31E-05	3,39E-04
LAMC1	12496	Medien	-	-0,409	1,10E-02	3,50E-02
		2D vs. 3D	-	0,2304	3,50E-02	8,51E-02
LUM	2594	Medien	-	-0,658	8,67E-04	6,00E-03
		2D vs. 3D	höher	2,0142	2,67E-09	2,36E-07
NID1	8760	Medien	höher	1,907	1,03E-06	8,12E-05
		2D vs. 3D	-	0,5804	2,32E-04	1,60E-03
OGN	0	Medien	-			
		2D vs. 3D	-			
PFN1	2383	Medien	-	0,414	0,027	0,07
		2D vs. 3D	-	-0,7967	2,46E-06	4,08E-05
POSTN	11345	Medien	niedriger	-1,666	1,40E-02	4,20E-02
		2D vs. 3D	höher	1,4966	1,02E-02	3,27E-02
PRELP	33	Medien	niedriger	-3,662	1,29E-06	9,30E-05
		2D vs. 3D	-	0,8254	2,61E-02	6,81E-02
SERPINA1	3	Medien	-			
		2D vs. 3D	-			

Glossar

2D-[Mediumabkürzung]	hPDSCs, die adhärent in dem genannten Medium kultiviert wurden
3D-[Mediumabkürzung]	hPDSCs, die dreidimensional in AMP in dem genannten Medium kultiviert wurden
AGRN	Genname Agrin, Heparansulfatproteoglykan
AMP	Agarose-Mikromulden-Platte
AMY1A	Genname α -Amylase 1
ANO1 = TMEM16A	Genname Anoctamin-1, (engl. <i>transmembrane member 16A</i>)
ANOVA	Varianzanalyse, (engl. <i>analysis of variance</i>)
ANXA2	Genname Annexin A2
<i>aq.</i>	In wässriger Lösung
ASPN	Genname Asporin, SLRP Klasse I
BGN	Genname Biglykan, SLRP Klasse I
bp	Basenpaar(e)
BPE	Rinderhypophysenextrakt, (engl. <i>bovine pituitary extract</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
CALR	Genname Calreticulin
CASK	Genname Calcium-/Calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase
CASP3	Genname Caspase 3, Apoptosemarker
cDNA	<i>complementary</i> DNA, durch reverse Transkription komplementär zu RNA generierte Desoxyribonukleinsäure
CHRM3	Genname Cholinerger Rezeptor Muskarinerg 3
COL[Zahl][A/B/C][Zahl]	Gen einer Kollagenuntereinheit
<i>count</i>	Einheit zu Quantifizierung von <i>reads</i> (s. u.)
CPM	<i>Counts-per-million</i>
C_t	Zyklus, bei dem Schwellenwert bei qPCR überschritten wird
DAG1	Genname Dystroglykan, Linkermolekül

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, färbt Zellkerne an
DCN	Genname Decorin, SLRP Klasse I
DEA	Differenzielle (Gen-)Expressionsanalyse
DEG	Differenziell exprimierte(s) Gen(e)
DGE	Differenzielle Genexpression
DMEM(/F12)	Dulbecco's modified Eagle medium (mit F12-Medium, 1:1)
DMEM10	DMEM mit 10 % FKS, Standardmedium für hPDSC-Kultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPT	Genname Dermatotontin, SMG-EZM-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>enricht</i>	von engl. <i>enriched</i> , zu Deutsch: auf Grundlage einer <i>Enrichment</i> -Analyse als statistisch signifikant durch DEG beeinflusst angesehen (für Details siehe S. 62)
FAM20A	<i>Member A of family with sequence similarity 20</i>
FBN1	Genname Fibrillin 1, SMG-EZM-Gen
FDA	Fluoresceindiacetat, färbt Zytosol lebender Zellen
FKS	Fetales Kälberserum
FN1	Genname Fibronectin
GJA1	Genname Connexin 43, (engl. <i>gap junction $\alpha 1$</i>)
GO	Gene Ontology
hPDSC	humane Parotis-abgeleitete Stammzelle (engl. <i>human parotid gland-derived stem cell</i>)
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HSPG2	Genname Perlecan, Heparansulfatproteoglykan
ibidi	Hersteller und Abkürzung der μ -Dish 35 mm-Zellkulturschalen
ITG[A/B/C][Zahl]	Genname einer Integrinuntereinheit
ITS	Mediumsupplemente Insulin, Transferrin, Selen
Ki67	Kiel 67, Proliferationsmarker, Genname MKI67
LAM[A/B/C][Zahl]	Genname einer Lamininuntereinheit

LRC	<i>Label-retaining cells</i> , zu Deutsch: langsam proliferierende Zellen, die einen DNA-Marker bei Teilung behalten
LUM	Genname Lumican, SLRP Klasse II
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger RNA</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Unterorganisation der <i>National Institutes of Health</i> (NIH), Vereinigte Staaten
NES	Genname Nestin
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> , Hochdurchsatzsequenzierung
NID1	Genname Nidogen 1, Linkermolekül der Basalmembran
OGN	Genname Osteoglycin, SLRP Klasse III
P	Passage
PBS(TT)	<i>Phosphate-buffered saline</i> (mit Triton-X100 und Tween20)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFN1	Genname Profilin 1, SMG-EZM-Gen
PI	Propidiumiodid, färbt Zellkerne toter Zellen
POSTN	Genname Periostin, Heparansulfatproteoglykan
PRELP	Genname Prolargin, SLRP Klasse II
qRT-PCR	Semi-quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion mit vorangegangener reversen Transkription
<i>read</i>	Sequenzstück in RNA-Seq
rhEGF	<i>Rekombinant human epithelial growth factor</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> , Wert zur Bestimmung der RNA-Integrität
RNA-Seq	Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren
RT	Raumtemperatur
SERPINA1	Genname <i>Serpin Family A Member 1</i> , SMG-EZM-Gen
SLRP	kleines Leucin-reiches Proteoglykan, engl. <i>small leucin-rich protein</i>

SMG	Submandibuläre Speicheldrüse (engl. <i>submandibular gland</i>)
TBS(T)	Tris-buffered saline (mit Triton-X100)
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TMEM16A = ANO1	<i>Transmembrane member 16A</i> = Anoctamin-1
VE-Wasser	Vollensalztes Wasser

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der Speichelsekretion.	11
Abbildung 2: Entwicklungsprozesse, Zellinteraktionen und Signalwege, die an der Speicheldrüsenorganogenese beteiligt sind.	14
Abbildung 3: Prozesse an der EZM in der Spaltenbildung.	15
Abbildung 4: Isolation der hPDSCs.	41
Abbildung 5: Herstellungsschritte der AMP.	45
Abbildung 6: 3D-Kultur der hPDSCs.	46
Abbildung 7: Wachstumsverhalten und Morphologie der hPDSCs änderten sich in epithelialen Differenzierungsmedien.	67
Abbildung 8: Adhärenz kultivierte hPDSCs änderten die mRNA-Expression von Stammzell- als auch speicheldrüsen-spezifischen Markern in epithelialen Differenzierungsmedien geringfügig.	69
Abbildung 9: hPDSCs ließen sich über 7 Tage dreidimensional als Sphäroide in AMP kultivieren.	71
Abbildung 10: Die hPDSC-Sphäroide in DMEM10 schienen in den ersten Tagen der Kultur kleiner zu werden; in DMEM/F12-EGF-Kultur zeigten die hPDSC-Sphäroide keine deutliche Größenveränderung.	72
Abbildung 11: Die in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierten Sphäroide wiesen eine hohe Vitalität auf, die in KSFM kultivierten Sphäroide eine geringe Vitalität.	74
Abbildung 12: Der Anteil der PI-positiven Sphäroide in KSFM war höher als in DMEM10 und DMEM/F12-EGF.	75
Abbildung 13: Die in DMEM10 und DMEM/F12-EGF kultivierten Sphäroide waren überwiegend vital und enthielten keinen nekrotischen Kern.	76
Abbildung 14: Die mRNA-Expression von Ki67 und Caspase 3 deuteten auf verringerte Proliferation in hPDSC-Sphäroiden gegenüber hPDSCs in adhärenter Kultur bei unveränderter apoptotischer Aktivität hin.	78

Abbildung 15: hPDSCs-Sphäroide aus DMEM/F12-EGF-Kultur exprimierten Stammzell- und Azini-spezifische Gene.	79
Abbildung 16: hPDSCs wiesen in allen Konditionen Nestin-positive Subpopulationen auf, die sich in hPDSC-Sphäroiden vorwiegend in äußeren Schichten befanden.	82
Abbildung 17: Die Mehrheit der <i>reads</i> waren assoziiert mit einem Gen.	84
Abbildung 18: Die Genexpression von in DMEM10 und DMEM/F12-EGF adhärent kultivierten hPDSCs unterschied sich in 1619 Genen signifikant.	85
Abbildung 19: Die Genexpression von adhärent und dreidimensional in DMEM/F12-EGF kultivierten hPDSCs unterschied sich in 1439 Genen signifikant.	86
Abbildung 20: Die differenzielle Genexpression in hPDSCs durch Veränderung der Zellkulturbedingungen war reproduzierbar.	88
Abbildung 21: <i>Heatmap</i> der Top 50 differenziell exprimierten Gene nach minimalem FDR: Das <i>Clustering</i> der Proben zeigte, dass die Expression stärker durch die Kulturkonditionen als durch die Herkunft der hPDSCs geprägt wurden.	90
Abbildung 22: Reacfoam-Visualisierung der ORA des Medienvergleichs: Die DEG beeinflussten EZM-Organisationsprozesse.	93
Abbildung 23: Reacfoam-Visualisierung der ORA des 2D-3D-Vergleichs: Die DEG beeinflussten EZM-Organisationsprozesse; niedrigere Genexpression in hPDSC-Sphäroiden beeinflusste Proliferations-assoziierte Prozesse.	96
Abbildung 24: Der Großteil der untersuchten EZM-Gene wurde in hPDSCs in den Differenzierungs-konditionen auf demselben Level oder höher als in hPDSCs in Standardkultur exprimiert.	98
Abbildung 25: hPDSC wiesen in allen Konditionen eine filamentöse Kollagen IV-Färbung auf, in hPDSC-Sphäroiden ist diese aber nicht eindeutig lokalisiert.	101
Anhang	
Abbildung A.4: Weder adhärent kultivierte hPDSCs noch hPDSC-Sphäroide zeigten sich in Immunfluoreszenzfärbungen eindeutig AQP5-positiv.	ii

Abbildung A.5: Weder adhärent noch in Sphäroiden kultivierte hPDSCs zeigten eine Immunfluoreszenzfärbung für CHR3.....iii

Abbildung A.6: Weder adhärent kultivierte hPDSCs noch hPDSC-Sphäroide zeigten sich in Immunfluoreszenzfärbungen eindeutig TMEM16A-positiv.....iv

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Chemikalien, Lösungen und Puffer.	34
Tabelle 2: Liste der Kits für die Molekularbiologie.	35
Tabelle 3: Liste der verwendeten QuantiTect-Primer.	36
Tabelle 4: Liste der Primärantikörper zur immunhistochemischen Färbung.	36
Tabelle 5: Liste der Isotypkontrollen zur Spezifizierung der Primärantikörper.	37
Tabelle 6: Liste der Sekundärantikörper mit konjugiertem Fluophor.	37
Tabelle 7: Liste des Verbrauchsmaterials.	37
Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte.	38
Tabelle 9: Liste der verwendeten Software und netzbasierter bioinformatischer Dienste.	39
Tabelle 10: Informationen zu den humanen Gewebeproben aus Parotiden und ihrer Verwendung.	40
Tabelle 11: Medien zur Stammzellisolation.	42
Tabelle 12: Medien in der Stammzellkultur.	43
Tabelle 13: Epitheliale Differenzierungsmedien.	44
Tabelle 14: Zusammensetzung der Färbelösung zur Vitalitätsanalyse samt Optima der Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe.	47
Tabelle 15: Zusammensetzung der Cell-Tak™-Lösung zur Beschichtung der ibidi- Zellkulturschalen.	48
Tabelle 16: Liste der mittels qRT-PCR untersuchten Marker und ihrer Bedeutung.	51
Tabelle 17: Lösungen zur Immunfluoreszenzfärbung.	52
Tabelle 18: Färbeprotokoll für zweidimensional kultivierte Zellen und kryofixierte Gewebeschnitte.	54
Tabelle 19: Färbeprotokoll für Sphäroide.	55

Tabelle 20: Prozessschritte der RNA-Sequenzierung samt Vorbereitung. 57

Tabelle 21: Details zur Datenaufbereitung der RNA-Seq-Ergebnisse in OmicsBox..... 58

Tabelle 22: Details zum *Enrichment* mit reactome.. 64

Anhang

Tabelle A. 1: Experimentelles Design für differenzielle Genexpressionsanalyse mit edgeR in Omicsbox..... vi

Tabelle A. 2: Die Mehrzahl der Gene, die Bestandteil adulter muriner EZM sind und die Differenzierung zu Speicheldrüsenzellen fördern, werden in hPDSC-Sphäroiden exprimiert oder sogar höher exprimiert als in adhärenter Kultur. vii