

Aus dem Institut für Medizinische und Marine Biotechnologie  
Direktor: Prof. Dr. Charli Kruse  
An der Fraunhofer-Einrichtung für Individualisierte und Zellbasierte Medizintechnik

**Untersuchung des Einflusses  
dreidimensionaler Kultivierung auf  
Neuronen und Schweißdrüsenzellen mit  
Fokus auf elektrophysiologischer  
Funktionalität**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Jörg Panzer  
aus Göttingen

Lübeck 2023

1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. vet. habil. Jennifer Hundt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2025

Zum Druck genehmigt: 07.03.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
1.1. Abstract . . . . .	7
<b>2. Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1. Modellsysteme der Biologie . . . . .	9
2.1.1. Tiermodelle . . . . .	9
2.1.2. Zellkultur . . . . .	10
2.1.3. 3D-Zellkultur . . . . .	10
2.2. Peripheres Nervensystem (PNS) . . . . .	13
2.2.1. Aufbau und Funktion des Nervensystems . . . . .	13
2.2.2. Wichtige Ionenkanäle und Marker . . . . .	17
2.2.3. Testsysteme für das PNS . . . . .	19
2.3. Schweißdrüsen . . . . .	22
2.3.1. Aufbau und Funktion . . . . .	23
2.3.2. Schweißdrüsen-assoziierte Krankheiten . . . . .	27
2.3.3. Modelle der Schweißdrüsenforschung . . . . .	28
2.4. Ziel dieser Arbeit . . . . .	30
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1. Material . . . . .	32
3.1.1. Chemikalien . . . . .	32
3.1.2. Verbrauchsmaterial . . . . .	34
3.1.3. Primer . . . . .	34
3.1.4. Kits . . . . .	36
3.1.5. Geräte . . . . .	36
3.1.6. Software . . . . .	37
3.1.7. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen . . . . .	38
3.2. Methoden . . . . .	40
3.2.1. 2D-Zellkultur . . . . .	40
3.2.2. 3D-Zellkultur . . . . .	40

3.2.3.	Isolation von humanen Schweißdrüsen . . . . .	42
3.2.4.	Vitalitätsfärbung . . . . .	42
3.2.5.	RNA-Isolation . . . . .	43
3.2.6.	Reverse Transkription . . . . .	43
3.2.7.	Primerdesign . . . . .	43
3.2.8.	Quantitative Real-Time-PCR . . . . .	44
3.2.9.	Kapillargelelektrophorese . . . . .	46
3.2.10.	Patch-Clamping . . . . .	46
3.2.11.	Calcium-Imaging . . . . .	48
3.2.12.	Statistik . . . . .	49
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
4.1.	Neuronale Zellen . . . . .	50
4.1.1.	2D- und 3D-Kultivierung der F11-Zellen . . . . .	50
4.1.2.	Expressionanalyse der F11-Zellen . . . . .	51
4.1.3.	Patch-Clamping an F11-Zellen . . . . .	55
4.2.	Schweißdrüsenzellen . . . . .	57
4.2.1.	Vergleich von Morphologie und Expressionsprofil der hSGSC-Linien	57
4.2.2.	3D-Kultivierung der hSGSCs . . . . .	60
4.2.3.	Expressionsanalyse der hSGSC-3D-Kultur . . . . .	61
4.2.4.	Patch-Clamping an hSGSCs . . . . .	63
4.2.5.	Calcium-Imaging an hSGSCs . . . . .	64
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
5.1.	Betrachtung des mRNA-Expressionsprofils in hSGSCs in Bezug auf die sekretorische Funktion . . . . .	67
5.2.	Identifizierung von geeigneten Referenzgenen für die qPCR-Analyse . . . .	69
5.3.	Effekte der Differenzierungsmedien auf die mRNA-Expression . . . . .	69
5.3.1.	Erhöhte Expression von Ntrk3 in F11-Zellen durch Differenzie- rungsmedium . . . . .	69
5.3.2.	Anstieg von CHRM3-Expression in hSGSCs durch Differenzierungs- medium . . . . .	70
5.4.	Effekte der 3D-Kultur auf die mRNA-Expression . . . . .	71
5.4.1.	3D-Kultur hat keinen Einfluss auf Ionenkanalexpression in F11-Zellen	71
5.4.2.	hSGSCs bilden kompakte Sphäroide mit veränderter Genexpression	72

5.5. Elektrophysiologische Eigenschaften der hSGSCs und F11-Zellen und Li- mitierung des automatisierten Patch-Clamping für multizelluläre Sphäroide	73
5.5.1. Starke Verringerung des NaV-Stroms durch Inhibition von NaV1.6 in F11-Zellen	73
5.5.2. Patch-Clamping an hSGSCs	73
5.5.3. Automatisiertes Patch-Clamping nicht auf Späroide anwendbar	75
5.6. Differenzierungsmedium erhöht maximalen Calciumeinstrom in hSGSC bei MCH-Stimulation	75
5.7. Fazit und Ausblick	76
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>106</b>
A.1. Abkürzungsverzeichnis	106
A.2. Abbildungsverzeichnis	109
A.3. Tabellenverzeichnis	110
A.4. Eidesstattliche Erklärung	113
A.5. Danksagung	114

# 1. Zusammenfassung

Tissue-Engineering und innovative Kulturmethode haben das Potential, in vielen Bereichen der klinischen Forschung zu neuen Therapiemöglichkeiten zu führen. Dazu gehören unter anderem die Schmerzforschung mit der Suche nach molekularen Zielen für Medikamente, sowie der Forschungsbereich der Wundheilung und Hautrekonstruktion. Die Umgebung der *in vitro* kultivierten Zellen ist dabei ein essentieller Faktor für deren Differenzierung und Funktion. In der vorliegenden Arbeit wurde für die kommerzielle neuronale Zelllinie F11, sowie für humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (*sweat gland derived stem cells*, hSGSCs), untersucht, ob die 3D-Kultivierung in Form von multizellulären Sphäroiden einen Einfluss auf die gewebspezifische Differenzierung hat.

Um multizelluläre Sphäroide zu erzeugen, wurden die Zellen mit der *liquid overlay*-Methode in Mikromulden aus Agarose kultiviert, was bei beiden Zelltypen zu einer spontanen Aggregation führte. Beide Zelltypen wurden in verschiedenen Medien in 2D und 3D kultiviert. Mittels RT-qPCR wurden auf mRNA-Ebene zelltypspezifische Genpanels analysiert, die Differenzierungsstatus und elektrophysiologische Aktivität ausgerichtet waren.

Für die F11-Zellen zeigte sich bei zwei untersuchten Differenzierungsmarkern eine deutlich veränderte Expression. Das neuronale Strukturprotein Neurofilament M (Nefm) wurde in der 3D-Kultur vermehrt exprimiert, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor Synaptotagmin 1 (Syt1) hingegen vermindert. Die Expression der weiteren Differenzierungsmarker sowie der untersuchten Ionenkanäle zeigte keine Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Kultur. Diese Ergebnisse lassen nicht auf eine veränderte Funktionalität der Zellen durch 3D-Kultivierung in Sphäroiden schließen. Um die elektrophysiologische Funktionalität der Zellen zu untersuchen, wurde automatisiertes Patch-Clamping angewendet. An dissoziierten F11-Zellen konnten erfolgreich Messungen durchgeführt werden, die Sphäroide jedoch ließen sich mit dieser Methode nicht analysieren. Die Frage nach einer veränderten elektrophysiologischen Funktionalität durch 3D-Kultivierung konnte somit nicht abschließend geklärt werden.

In den untersuchten hSGSCs konnte die Expression von wichtigen funktionellen Markern sekretorischer Schweißdrüsenzellen gezeigt werden. Die 3D-Kultivierung hatte einen

deutlichen Effekt auf einige dieser Marker. Der muskarinerge Acetylcholinrezeptor M3 (CHRM3) und der calciumgesteuerte Calciumkanal ORAI1 wurden in 3D-Kultur verringert exprimiert, der calciumgesteuerte Chloridkanal Anoctamin 1 (ANO1, auch TMEM16A) wurde verstärkt exprimiert. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse ließen auf eine veränderte Funktionalität in 3D- gegenüber 2D-Kultur schließen. Im Patch-Clamping konnten, wie bei F11-Zellen, nur Einzelzellen analysiert werden. Zur weiteren Untersuchung der Funktionalität wurde ein Calcium-Imaging-Assay durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Calciumkonzentrationszunahme beobachtet werden. Der Anteil an stimulierbaren Zellen unterschied sich ebenfalls nicht signifikant voneinander. Die Kultivierung in einem Differenzierungsmedium führte bei hSGSCs zu einer erhöhten CHRM3-Expression in der Zellpopulation sowie einem erhöhten Anteil an MCH-reaktiven Zellen.

### 1.1. Abstract

In many areas of clinical research, tissue engineering and innovative culture methods have the potential to lead to new types of therapy. That includes pain research with the exploration of new drug targets, as well as regeneration and skin reconstruction. The microenvironment of *in vitro* cultured cells is a crucial point regarding their differentiation and function. In this work, it has been investigated if three-dimensional (3D) culturing using multicellular spheroids has an effect on tissue-specific differentiation of the neuronal cell line *F11* and human sweat gland derived stem cells (hSGSCs). To generate multicellular spheroids, cells were cultured using two different media while applying the liquid overlay technique and using micromoulds made of agarose, leading to spontaneous aggregation in both cell types.

Gene expression was examined on mRNA levels with reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) using cell type-specific gene panels focusing on differentiation and electrophysiological activity. For F11 cells, a differential expression in the 3D-culture could be observed for the neurostructural protein Neurofilament M (Nefm) and the calcium sensory protein Synaptotagmin 1 (Syt1). The expression of further markers of differentiation and ion channels was not affected by the type of culture. To specifically analyze the electrophysiological functionality of the cells, automated patch clamping was used. Patch clamp measurements were possible in dissociated F11-cells from 2D culture, while measurements including spheroids were unsuccessful. In hSCSCs, the expression of important functional markers of secretory sweat gland cells could be shown in 2D-culture. 3D culture had a distinct effect on some of these markers. Decreased

expression levels of the muscarinic acetylcholine receptor M3 (CHRM3) and the calcium controlled calcium channel ORAI1 could be observed, whereas expression of the calcium controlled chloride channel Anoctamine 1 (ANO1, also TMEM16A) was increased. These findings imply an altered functionality of hSGSCs cultured in multicellular spheroids. In patch clamping experiments, only single, dissociated cells could be measured, congruent with the results of F11 cells. Calcium imaging experiments were used for further investigation, where significant differences in the maximum increase of calcium concentration under stimulation with methyl-acetylcholine could not be observed. The ratio of cells reacting to the stimuli was also not significantly different between 2D and 3D cultures.

## 2. Einleitung

### 2.1. Modellsysteme der Biologie

In der Humanbiologie werden Modelle benötigt, um Grundlagen der Physiologie und Pathologie zu erforschen, sowie Wirkweisen von Substanzen wie Medikamenten oder Giftstoffen zu untersuchen. Für humanbiologische Fragestellungen gibt es drei Kategorien von Modellen: Zellen, Gewebe bzw. Organe, und Tiere. Für Modellsysteme gilt generell und besonders auch für die Biologie, dass die Aussagekraft der Ergebnisse abhängig ist vom Grad der Komplexität [Geuna et al., 2016]. Komplexe Systeme sind jedoch wesentlich anspruchsvoller, was die Kosten und den technischen Aufwand angeht.

#### 2.1.1. Tiermodelle

Die Nutzung von Tieren als Modell für die menschliche Anatomie und Physiologie begann etwa im 6. Jahrhundert v. Chr. in Form von Leichenschauen an Hunden. Die Verwendung von Tieren für Forschungszwecke verbreitete sich rasch und wurde zu einem wichtigen Instrument für europäische und arabische Mediziner für anatomisches Verständnis und die Erprobung von chirurgischen Eingriffsmethoden. [Ericsson et al., 2013] Um Erkenntnisse über den menschlichen Körper und Wirkung von Umwelteinflüssen zu untersuchen, wurden in nachfolgenden Jahrhunderten Experimente mit unzähligen Tierarten gemacht. Die Auswahl einer (natürlich vorkommenden) Spezies für eine bestimmte vergleichende Fragestellung, auch komparative Methode genannt, war und ist eine besondere Herausforderung, die 1929 von August Krogh folgendermaßen ausgedrückt wurde: “For a large number of problems there will be some animal of choice or a few such animals on which it can be [most] conveniently studied.” [Krogh, 1929] Ein Beispiel dafür sind Hunde, die als Modell für Hämophilie (Bluterkrankheit) etabliert sind. Im Gegensatz zu anderen Modellorganismen kommt diese Krankheit bei Hunden natürlicherweise vor, die Pathomechanismen und Symptome sind dabei größtenteils die gleichen wie beim Menschen. Dies hat einen großen Translationserfolg auf die humane Medizin zur Folge. [Sohn, 2015]

Für tierische Modelle gibt es im Allgemeinen zwei limitierende Aspekte zu beachten. Zum einen ist die Zucht, das Experimentieren und das anschließende Töten von Tieren

ethisch problematisch. 1959 wurde von William Russell und Rex Burch hat das RRR-Prinzip in der Wissenschaft etabliert, wonach die Tierversuche durch andere Modelle ersetzt (*replace*), reduziert (*reduce*) oder verbessert (*refine*) werden sollen [Russel and Burch, 1960]. Der zweite Aspekt ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit von Menschen und Tieren - Translationshürde genannt. Auch wenn es auf zellulärer Ebene viele Ähnlichkeiten und Gemeinsamkeiten gibt, sind Erkenntnisse, die aus tierischen Modellen gewonnen werden, nicht per se auf den Menschen übertragbar. Besonders im Bereich der Pharmakologie bzw. der medizinisch angewandten Forschung wird dies an der geringen Translationsrate von Ergebnissen aus Tierexperimenten auf den Menschen deutlich [Hackam and Redelmeier, 2006, Hutchinson and Kirk, 2011].

### 2.1.2. Zellkultur

In der Zellbiologie wird zwischen Zelllinien und Primärzellen unterschieden. Zelllinien entstehen aus Körperzellen, die durch Mutation oder biotechnologische Manipulation die Fähigkeit gewonnen haben, sich unbegrenzt zu teilen. Primärzellen dagegen sind physiologisch agierende Zellen, die mit Ausnahme von Stammzellen eine limitierte Teilungsfähigkeit haben (Hayflick-Limit). Immortalisierte Zelllinien lassen sich aus Tumorgewebe isolieren, sie können aber auch durch Infektion mit bestimmten Viren oder das Einbringen von bestimmten Genen, sowie durch Fusion mit Tumorzellen (Hybridisierung) hergestellt werden. Diese Techniken wurden um 1990 etabliert. [Irfan-Maqsood et al., 2013].

Bis zur heutigen Zeit wurden eine Vielzahl an Zelllinien sowie Protokollen zur Isolation und Kultivierung von primären Zellen etabliert. Die Zellkultur gehört zum Standardrepertoire der meisten biologischen Labore und hat im Laufe ihrer Entwicklung zu einer Vielzahl von neu gewonnenen Erkenntnissen beigetragen. Ähnlich der Zellkultur ist die Gewebe- oder Organkultur. Hierbei wird ein Stück Gewebe oder ein ganzes Organ aus einem Organismus entnommen und im Labor am Leben gehalten. Auch menschliches Gewebe kann dafür genutzt werden.

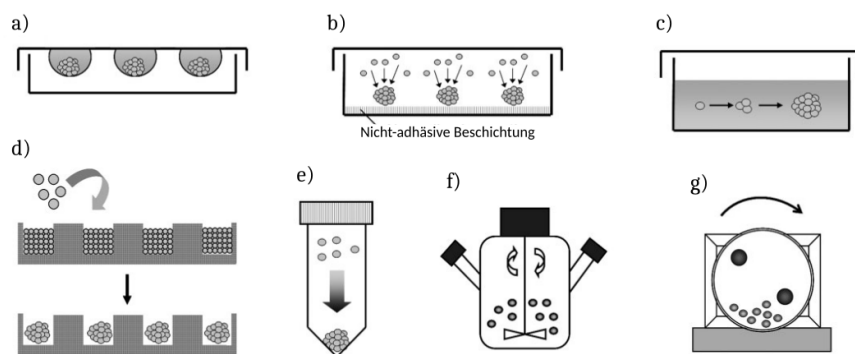
### 2.1.3. 3D-Zellkultur

In der klassischen 2D-Kultur ist die Interaktion der Zellen beschränkt auf die seitlichen Nachbarzellen und den (meist festen) Untergrund. Die Morphologie und die Eigenschaften der Zellen in 2D-Kultur entsprechen oft nicht dem *in vivo*-Zustand [Antoni et al., 2015].

In einer 3D-Kultur werden die Zellen in einer festen, gelartigen Matrix und/oder in Aggregaten, auch multizelluläre Sphäroide genannt, kultiviert. Es gibt zu allen Seiten

Interaktionsmöglichkeiten für die Zellen. Dieser Zustand entspricht der natürlichen Umgebung der meisten Zellen im Organismus. Diese Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sind wichtige Signale für die Zelle und beeinflussen viele zelluläre Parameter wie Metabolismus, Morphologie und Funktion. Die Festigkeit der Matrix kann in der 3D Kultur flexibel gestaltet werden, um die die *in vivo*-Umgebung verschiedener Zelltypen optimal nachzuahmen. Diese Matrices können aus vielen verschiedenen künstlichen oder natürlichen Substanzen bestehen. Je nachdem welcher Zelltyp kultiviert werden soll, sind die Ansprüche an mechanische und chemische Beschaffenheit teils sehr unterschiedlich. Häufig verwendete Substanzen sind zum Beispiel Alginate und Kollagen.

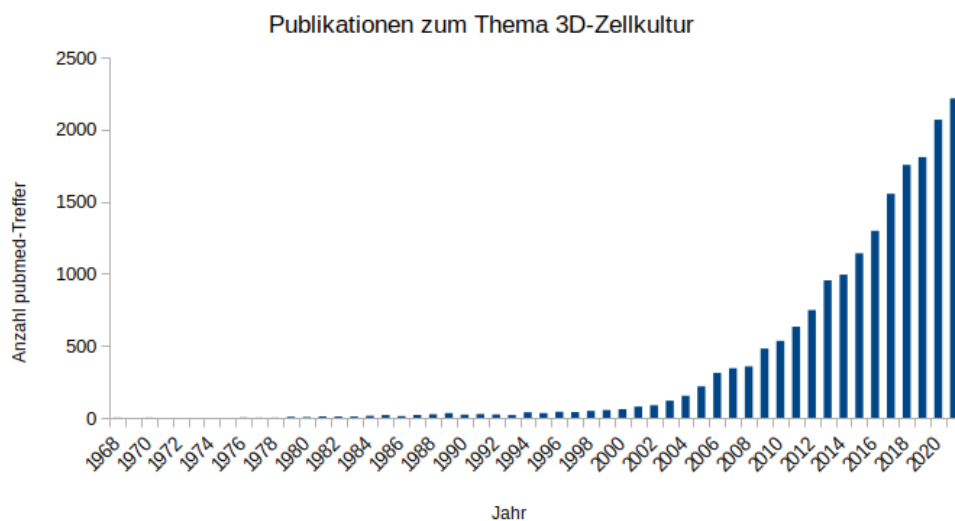
Zum anderen können Zellen in multizellulären Aggregaten kultiviert werden. Weitere gebräuchliche Namen sind *organoid bodies (OB)*, Multizelluläre Sphäroide (*multicellular spheroids, MCS*). Zusätzlich gibt es noch organspezifische Bezeichnungen wie *neurospheres* und *embryoid bodies (EB)*. Um Zellaggregate zu generieren, gibt es verschiedene Methoden (siehe Abbildung 2.1). Allen gemein ist die Voraussetzung, dass den Zellen keine Adhäsionsmöglichkeit an der Oberfläche des Kulturgefäßes geboten wird. Bei den meisten Zelltypen kommt es dann zur spontanen Aggregation. Zum ersten Mal beschrieben wurde die Kultivierungsmethode der multizellulären Sphäroide von Holtfreter und Moscona [Holtfreter, 1944, Moscona and Moscona, 1952].



**Abbildung 2.1.: Methoden zur Generierung von multizellulären Sphäroiden.** Die gebräuchlichsten Methoden sind (a) Kultur in hängenden Tropfen, (b) Kultur auf nicht-adhäsiven Oberflächen, (c) monoklonale Kultur, (d) Kultur in Mikro-Mulden, (e) Zentrifugationspellet-Kultur, (f) Kultur in *Spinner Flasks* und (g) Kultur in Rotationssystemen. Modifiziert nach [Lin and Chang, 2008].

Die Etablierung der 3D-Zellkultur wurde vor allem im Bereich der Krebsforschung vorangetrieben [Abbott, 2003]. Nach den ersten Publikationen zu diesem Stichwort in den Jahren 1968 und 1970 [Boiron et al., 1968, Lang and Bickel, 1970] war es zwei

Jahrzehnte lang sehr ruhig auf diesem Forschungsgebiet. Der nächste Meilenstein in der 3D-Kultur war 1996 die Entdeckung, dass Tumorzellen in der 3D-Kultur deutlich anders auf die Inhibierung von Integrinen reagierten als in 2D. In Zellaggregaten führte diese Behandlung zu einer Reversion des malignen Phänotyps, in 2D konnte dieses Verhalten jedoch nicht beobachtet werden. [Weaver et al., 1997] Ab diesem Zeitpunkt stieg die Veröffentlichungsrate in diesem Gebiet stark an (siehe Abbildung 2.2), die Methode wurde immer mehr auch in nicht-Tumorzellen betreffenden Forschungsgebieten eingesetzt.



**Abbildung 2.2.: Publikationen im Bereich der 3D-Zellkultur.** Eine *Pubmed*-Suche ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) nach den Stichworten “3D AND (cell culture)” ergab bis zum Jahr 2021 18433 Treffer. Der erste Eintrag ist auf 1968 datiert, ab 1997 steigt die Anzahl der Treffer monoton an.

Für bestimmte Zelltypen hat die Methode der 3D-Kultur eine Kultivierung überhaupt erst möglich gemacht. So konnten Keratinozytenprogenitorzellen in 3D in einem undifferenzierten Zustand bei physiologischer Calciumkonzentration kultiviert werden [Wallace and Reichelt, 2013]. Ferreira *et al.* erreichten mit Hilfe der 3D-Kultur eine Kultivierung von primären Speicheldrüsenzellen mit einer stabilen Expression von Speicheldrüsenmarkern [Ferreira et al., 2019]. Auch primäre Epithelzellen aus der Mundschleimhaut konnten in 3D in eine phänotyperhaltende Kultur gebracht werden [Zurina et al., 2018].

Eine weiteres spannendes Einsatzgebiet der 3D-Kultur ist die Vermehrung und Differenzierung von Stammzellen [Chaicharoenaudomrung et al., 2019]. Beispielsweise gelang es Beauchamp *et al.*, mit Hilfe von 3D-Kultur aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) funktionelle Kardiomyozyten zu generieren [Beauchamp et al., 2015].

Die molekularen Effekte der 3D-Kultivierung sind vielfältig, eine wichtige Rolle scheinen dabei verschiedene extrazelluläre Adhäsionsmoleküle und das daran gebundene Zytoskelett zu spielen. Die Zellen binden über membranständige Adhäsionsmoleküle an umgebene Zellen und Matrixproteine. Die Bindung und die veränderte Spannung des Zytoskelettes lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die wiederum zu einer erhöhten Bildung von Adhäsionsmolekülen führt. Beipielsweise konnte in 3D-kultivierten mesenchymalen Stammzellen (MSCs) sowie in epithelialen ovarialen Krebszellen eine erhöhte Expression von E-Cadherin nachgewiesen werden [Lin and Chang, 2008, Lee et al., 2013]. Diese Signalkaskaden haben daneben einen Einfluss auf die Expression von vielen weiteren Proteinen. Unter anderem in MSCs gehören dazu verschiedene Stammzellmarker wie *octamer-binding transcription factor (OCT) 4* und *SRY (sex determining region Y)-Box (SOX) 2* [Guo et al., 2014, Su et al., 2013]. Für einige Zelltypen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Rho-GTPasen eine tragende Rolle bei den Expressionsänderungen durch 3D-Kultivierung spielen [McBeath et al., 2004, Woods et al., 2007].

## 2.2. Peripheres Nervensystem (PNS)

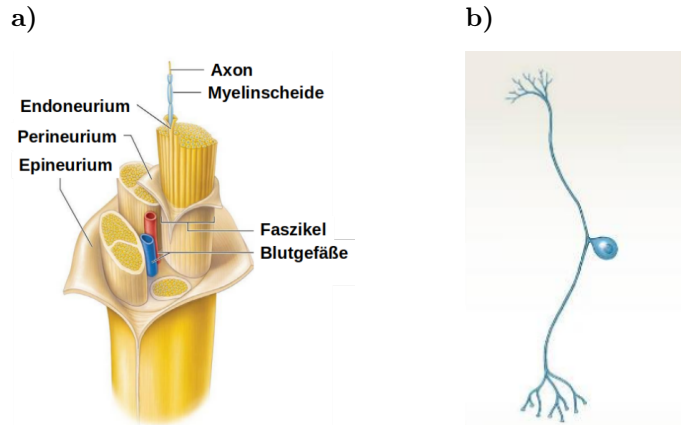
### 2.2.1. Aufbau und Funktion des Nervensystems

Das Nervensystem des menschlichen Körpers dient zum Einen der Kommunikation mit der Umwelt, zum Anderen ermöglicht es komplexe kognitive Vorgänge wie Vorstellungskraft, Emotionen und Speichern von Informationen. Es besteht aus Neuronen, die für die Reizweiterleitung zuständig sind, sowie aus unterstützenden Gliazellen, die unter anderem für Entwicklung, Versorgung, Schutz und Reparatur der Neuronen verantwortlich sind. Funktionell wird zwischen somatischem und autonomen, auch vegetativ genannten Nervensystem unterschieden. Das somatische Nervensystem ist für die willkürliche motorische Steuerung und die bewusste Wahrnehmung der Körperperipherie zuständig. Das autonome Nervensystem erfüllt die Aufgabe der unbewussten und unwillkürlichen Steuerung der inneren Organe, dazu gehören zum Beispiel Verdauung und Blutdruckregulation. [Trepe, 2017]

Eine grobe topografische Einteilung erfolgt in peripheres und zentrales Nervensystem (PNS / ZNS). Zum ZNS werden die Neuronen im Gehirn und Rückenmark gezählt. Es ist für Verarbeitung von sensorischen Reizen aus der Peripherie, kognitive Funktionen und motorische Steuerung des Körpers zuständig. Das PNS beschreibt alle Neuronen, die außerhalb des ZNS liegen und ist zuständig für die Wahrnehmung von endogenen (körpereigen) und exogenen (körperfremden) Bedingungen, sowie die Verbindung vom

ZNS zu seinen Zielorganen. Der afferente Teil übermittelt die Reize der Rezeptoren an das ZNS, der efferente Teil leitet die Reize des ZNS an Muskeln und Drüsengewebe weiter. Die Zellkörper der peripheren Nervenzellen sind meist in so genannten Ganglien gebündelt. [Drenckhahn and Benninghoff, 2009, Martini et al., 2012]

Ein peripherer Nerv besteht aus vielen Nervenfaserbündeln (Faszikel), die wiederum aus vielen umhüllten Axonen (Nervenfasern) gebildet werden (siehe Abbildung 2.3a). Es wird unterschieden zwischen Hirnnerven, die vom Gehirn abgehen, und Spinalnerven, die vom Rückenmark abgehen. Die Spinalnerven treten paarweise aus dem Rückenmark aus. Aus der Hinterwurzel der Wirbelkörper treten die sensorischen Nervenfasern aus, aus der Vorderwurzel die motorischen. Die Zellkörper der motorischen Nerven befinden sich im Rückenmark, die der sensorischen liegen dagegen außerhalb des Rückenmarks in den Hinterwurzelganglien (englisch *dorsal root ganglia*, *DRG*). [Trepe, 2017] Die Neuronen der sensorischen Nerven haben eine pseudounipolare Form (siehe Abbildung 2.3b). Die Reize aus der Peripherie werden dadurch direkt ins Rückenmark weitergeleitet, ohne den Zellkörper durchlaufen zu müssen. Dies hat eine erhöhte Reizweiterleitungsgeschwindigkeit zur Folge. [Willis, 2007] Neben Temperaturempfinden, Tastsinn, Geschmacks- und Geruchssinn sowie Gleichgewichtssinn und räumlicher Eigenwahrnehmung (Propriozeption), gehört auch die Wahrnehmung von Schmerzreizen zu den Aufgaben des PNS [Trepe, 2017].



**Abbildung 2.3.: Aufbau der Nerven.** (a) Die myelinumhüllten Neuronen (Nervenfasern) sind zu Faszikeln gebündelt, die wiederum zusammen einen Nerv bilden. Jede Untereinheit ist von einer Hülle umgeben, die Endo-, Peri- bzw. Epineurium genannt werden. Modifiziert nach [Marieb and Hoehn, 2010]. (b) Periphere Neuronen wie die der Hinterwurzelganglien gehören zur Gruppe der pseudounipolaren. Diese Zellen besitzen einen einzigen Neuriten, welches sich aufteilt in einen dendritischen Teil, an dessen Ende die reizwahnemenden Nervenendigungen liegen, und einen axonalen Teil, der ins Rückenmark projiziert. Modifiziert nach [Martini et al., 2012].

Schmerz beschreibt ein subjektives Empfinden von Reizen, die durch nozizeptive Nervenfasern vermittelt werden. Nozizeption bedeutet Wahrnehmung einer Noxe, Noxe bezeichnet einen (potentiell) gewebeschädigenden Stimulus wie zum Beispiel starke Hitze (lateinisch *noxa* “Schaden”). Nozizeptive Reize entstehen in Nervenendigungen des PNS durch thermische, chemische oder mechanische Stimulation und werden an das ZNS weitergeleitet und dort verarbeitet. Es gibt verschiedene Subtypen von sensorischen Nervenfasern, eine Übersicht ist in Tabelle 2.1 gegeben. Nozizeption wird normalerweise über A $\delta$ - und C-Fasern realisiert. [Kuner and Flor, 2017] Unter bestimmten Umständen können auch A $\beta$ -Fasern, die eigentlich für die Wahrnehmung von Berührung und Vibration zuständig sind, Schmerzsignale aussenden [Devor, 2009].

**Tabelle 2.1.: Subtypen von sensorischen Nervenfasern.** Die Subtypen unterscheiden sich deutlich im Myelinisierungsgrad, was eine Diskrepanz in der Reizweiterleitungsgeschwindigkeit ( $V_R$ ) zur Folge hat. Die Reizweiterleitung der verschiedenen primären Modalitäten wird von unterschiedlichen Nervenfasersubtypen übernommen. [Bourinet et al., 2014, Purves et al., 2018]

Name	Myelinisierung	$V_R$ [m/s]	Primäre Reizmodalität
A $\alpha$	stark	70-120	Propriozeption
A $\beta$	stark	30-70	Propriozeption, Berührung und Vibration
A $\delta$	schwach	5-30	Schmerz
C	keine	0,5-2	Schmerz

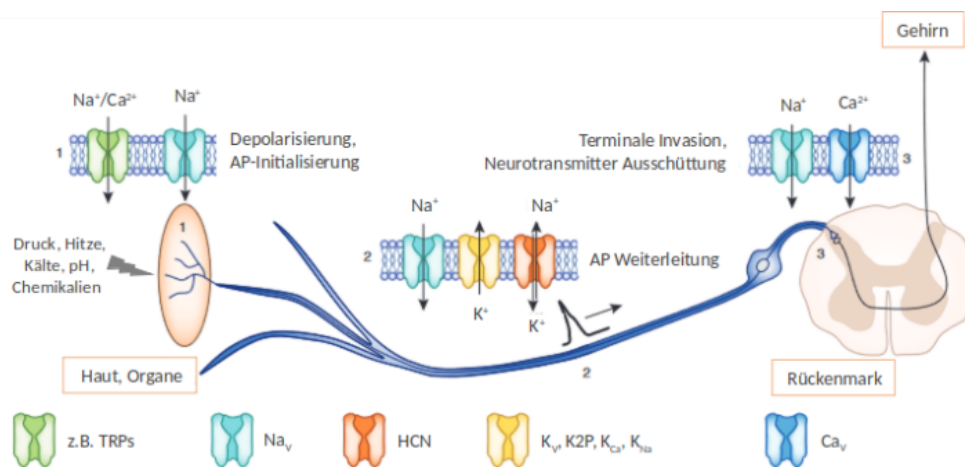
Die resultierende Schmerzempfindung des Individuums hängt neben der Stärke des Schmerzreizes auch von anderen Faktoren wie emotionalem Zustand, Schmerzerinnerung und körperlichem Allgemeinzustand ab (Multidimensionalität) [Carr and Mann, 2017]. Die physiologische Funktion der Schmerzwahrnehmung besteht im Verhindern von Verletzungen und ist für den Menschen lebenswichtig. Eine Störung des Schmerzsystems kann dazu führen, dass Schmerzreize ungewöhnlich stark wahrgenommen werden (Hyperalgesie) oder dass Stimuli, die normalerweise keine Schmerzen auslösen, als schmerzhaft wahrgenommen werden (Allodynie). Wird die Störung des Schmerzsystems nicht behoben, kommt es zu einer erheblichen Beeinflussung der Lebensqualität der betroffenen Individuen. [Manion et al., 2019] Schmerzstörungen (auch chronische Schmerzen, abzugrenzen von akuten Schmerzen) betreffen etwa 25 % der EU-Bevölkerung und stellen damit eine enorme Herausforderung in der Medizin dar [Leadley et al., 2012]. Die Auslöser sind dabei sehr heterogen, Schmerzstörungen lassen sich generell in drei Arten unterteilen: inflammatorisch, neuropathisch und dysfunktionell [Costigan et al., 2009].

Bei inflammatorischen Schmerzen bzw. Schmerzstörungen führen inflammatorische Mediatoren wie bestimmte Cytokine zu einer Sensibilisierung des Schmerzsystems. Zu auslösenden Bedingungen gehören auch Gewebedegeneration, wie sie z.B. bei rheumatoider Arthritis auftritt. Inflammatorischer Schmerz ist vermutlich ein evolutionär sinnvolles Phänomen, da es zur Schonung von verletzten Körperteilen und damit zur Heilung beitragen kann. Neuropathische Schmerzen werden durch Inflammation oder Verletzung des Nervensystems ausgelöst und gehören zu den am schlechtesten behandelbaren Schmerzstörungen [Manion et al., 2019]. Beispiele für neuropathische Schmerzstörungen sind diabetische Neuropathie, alkoholbedingte Polyneuropathie und Phantomschmerzen [Dworkin et al., 2003]. Die Gruppe der dysfunktionellen Schmerzstörungen beinhaltet alle Schmerzstörungen ohne erkennbare Schädigung oder Entzündung des Nervensystems oder anderen Gewebes, wobei das nicht-Erkennen nicht zwingend durch ein nicht-Vorhandensein bedingt sein muss. Zu den dysfunktionalen Schmerzstörungen gehören beispielsweise Fibromyalgie (umgangssprachlich auch Weichteilrheuma genannt) und Reizdarmsyndrom. [Manion et al., 2019] Neuropathische und dysfunktionelle Schmerzstörungen entstehen durch abnormale Funktion des somatosensorischen Systems und erfüllen keinerlei schützende Funktion für den Organismus [Costigan et al., 2009].

Um chronische Schmerzen zu verhindern bzw. zu heilen, muss primär die Ursache für die Erkrankung behoben werden. In vielen Fällen ist die Ursache aber nicht erkennbar oder nicht behebbar, was ein großes Problem der Schmerztherapie darstellt [Manion et al., 2019]. Das andere Problem ist, dass durch chronische Schmerzen sekundäre Veränderungen in Gang gesetzt werden, die auch nach Beheben der primären Ursache die chronischen Schmerzen aufrecht erhalten können [Kuner and Flor, 2017, Manion et al., 2019].

Während kurzzeitige Schmerzentlastung gut realisierbar ist, sind die Möglichkeiten für eine langfristige Schmerzentlastung noch sehr beschränkt, bzw. mit großen Nebeneffekten behaftet. Hauptgrund dafür ist, vor allem bei Therapien von neuropathischen Schmerzen, laut Manion *et al.* die Fokussierung der Forschung auf die Schmerzweiterleitung, anstatt auf die Faktoren, die für die Aufrechterhaltung der Schmerzen verantwortlich sind [Manion et al., 2019]. Zu diesen Faktoren zählen zum Beispiel Gliazellaktivierung, periphere und zentrale Sensibilisierung und Verlust von inhibitorischen Neuronen [Kuner and Flor, 2017, Manion et al., 2019]. Auch nicht-somatische Eingriffe wie Psychotherapie können einen wichtigen Beitrag zur Schmerztherapie leisten, da das Schmerzempfinden neben der somatischen auch immer eine psychische Komponente hat und in vielen Fällen psychische Co- oder Grunderkrankungen vorliegen [Simon et al., 1999, Ginting et al., 2011, Radat et al., 2013, Ogunlana et al., 2015, Manion et al., 2019].

## 2.2.2. Wichtige Ionenkanäle und Marker



**Abbildung 2.4.: Wichtige Ionenkanäle der primären Nozizeption.** Am Anfang steht ein nozizeptiver Reiz, der durch Rezeptorproteine wie *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle wahrgenommen wird und zu einem unselektiven Einstrom von Kationen ( $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) und damit zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt. Ist der Reiz stark genug, übersteigt das Membranpotential einen Schwellenwert und es kommt zur Bildung eines Aktionspotentials (AP). Die Bildung und Weiterleitung des APs werden durch spannungsgesteuerte  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{Na}_V$  und  $\text{K}_V$ ) realisiert. Das AP wandert von der Stelle des Stimulus über das Axon bis zur Synapse Rückenmark. Dort kommt es zu einer Aktivierung von  $\text{Ca}_V$ -Kanälen. Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  führt zur Ausschüttung von Neurotransmittern, die wiederum in der postsynaptischen Membran des nachfolgenden Neurons eine Depolarisation auslösen. Von hier wird der Reiz dann zum Gehirn weitergeleitet und dort verarbeitet. Modifiziert nach [Waxman and Zamponi, 2014].

Die Schmerzweiterleitung ist ein Zusammenspiel vieler spannungs- und ligandenaktivierter Ionenkanäle (siehe Abbildung 2.4). Zu ihren Aufgaben gehört die Detektion einer Noxe, das Aufbauen und Weiterleiten eines Aktionspotentials, Regulation des neuronalen Erregungsmusters und Initiation der Neurotransmitterausschüttung an den Synapsen im Rückenmark. Das Detektieren von Noxen und anderen Stimuli wird vor allem über TRPs (*transient receptor potential*) realisiert. TRPs sind nicht-selektive Kationenkanäle, ihre Aktivierung führt zum Einstrom von Natrium- ( $\text{Na}^+$ ) und Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Das Vorhandensein von verschiedenen Subtypen und deren Häufigkeit bestimmen die Sensibilität der Zelle für verschiedene Reize. Für einige Mitglieder der TRP-Familie konnte eine Beteiligung an Schmerzstörungen gezeigt werden. Ein Beispiel ist der Capsaicin-sensitive TRPV1 (TRP Vanilloid Typ 1). Er ist ein Sensor für starke Hitze, wird unter anderem in nozizeptiven sensorischen Neuronen exprimiert und ist beteiligt bei peripherer inflammatorischer Sensibilisierung [Kanai et al., 2007], entzündlichen Darmerkrankungen [Akbar et al., 2010] und Reizdarmsyndrom [Akbar et al., 2008].

Wird durch die Öffnung der TRPs ein Schwellenwert des Membranpotentials überschritten, kommt es zur Aktivierung von spannungsgesteuerten Natrium- und Kaliumkanälen ( $\text{Na}_V$  bzw.  $\text{K}_V$ ). Die  $\text{Na}_V$ - und  $\text{K}_V$ -Kanäle produzieren ein Aktionspotential und leiten es bis zur im Rückenmark liegenden Synapse weiter. Viele der beteiligten  $\text{Na}_V$ -Subtypen konnten mit Schmerzstörungen in Verbindung gebracht werden. Darunter ist zum Beispiel  $\text{Na}_V1.6$ , welcher durch das Gen *SCNA8A* codiert und sowohl im ZNS, als auch im PNS exprimiert wird [O'Brien and Meisler, 2013]. Xie *et al.* konnten durch einen *knock-down* (Unterdrücken der Genexpression) zeigen, dass  $\text{Na}_V1.6$  eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Schmerzstörungen spielt. Das akute Schmerzempfinden wurde durch den *knock-down* nicht gestört, dieser Rezeptor ist demnach ein mögliches therapeutisches Ziel bei chronischen Schmerzen. [Xie et al., 2013]

Die  $\text{K}_V$ -Kanäle bestimmen entscheidend die Erregungsfrequenz und -dauer von Neuronen. In peripheren sensorischen Neuronen wird eine Vielzahl verschiedener  $\text{K}_V$ -Subtypen exprimiert. Eine verringerte Expression dieser Kanäle kann zu verschiedenen Schmerzstörungen führen. [Waxman and Zamponi, 2014] Beispielsweise ist  $\text{K}_V4.3$  (codiert durch das Gen *KCND3*) verringert exprimiert bei diabetischer Neuropathie [Cao et al., 2010]. Ein weiteres Beispiel ist  $\text{K}_V7.2$  (codiert durch das Gen *KCNQ2*). In einem Knochenkrebsmodell mit Schmerzstörung konnte eine verminderte Expression dieses Kanals beobachtet werden, die pharmakologische Aktivierung führte zur Verringerung der Schmerzsymptome [Zheng et al., 2013]. Auch in einem Modell für inflammatorische Schmerzen führte die pharmakologische Aktivierung dieses Rezeptors zu einer Verminderung der Schmerzsymptome [Xu et al., 2010].

Eine weitere Familie der spannungsgesteuerten Kanäle sind die *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* (HCN)-Kanäle. Sie werden durch Hyperpolarisation aktiviert, die Aktivierungsschwelle wird durch Bindung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in den weniger negativen Bereich verschoben. Im geöffneten Zustand sind sie durchlässig für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen, der resultierende Strom wird als  $I_h$  (h für Hyperpolarisation) oder  $I_f$  (f für *funny*) bezeichnet. Dieser Strom stabilisiert zum Einen das Membranpotential, zum Anderen kann er als Schrittmacherstrom fungieren, um Erregungen zu initiieren. [He et al., 2014] Alle vier Subtypen (HCN1-4) kommen sowohl im Gehirn, als auch in peripheren sensorischen Neuronen vor. In den verschiedenen DRG-Subklassen ist das Verteilungsmuster dabei sehr unterschiedlich [Kouranova et al., 2008]. Dunlop *et al.* beschreiben eine große Rolle von HCN-Kanälen an bestimmten neuropathischen Schmerzstörungen [Dunlop et al., 2009], HCN2 ist dabei von besonderer Bedeutung [Emery et al., 2011].

Eine Reihe von nicht-spannungsaktivierten Kaliumkanälen modulieren die Erregbar-

keit von peripheren sensorischen Neuronen. Darunter fällt zum Beispiel KCNK3 (*potassium two pore domain channel subfamily K member 3*, auch K<sub>2P</sub>3.1 oder TASK1). KCNK3 sorgt für einen Kaliumhintergrundstrom, welcher das Ruhepotential der Zelle mitbestimmt [Baumann et al., 2004]. Eine verringerte Expression ist assoziiert mit erhöhtem Schmerzverhalten bei Inflammation [Marsh et al., 2012].

Das Aktionspotential, welches in den Nervenendigungen in der Peripherie entsteht, wird über das Axon bis zum Rückenmark weitergeleitet und aktiviert dort spannungsaktivierte Calciumkanäle (Ca<sub>V</sub>). Die Ca<sub>V</sub>-Kanäle vom N-Typ haben eine hohe Aktivierungsschwelle, ihre primäre Funktion ist das Auslösen der Ausschüttung von Neurotransmittern. Ca<sub>V</sub>-Kanäle vom T-Typ haben eine niedrige Aktivierungsschwelle und regulieren die Erregbarkeit der Zelle. [Bourinet et al., 2014] Die T-Typ Ca<sub>V</sub>-Kanäle scheinen exklusiv in bestimmten peripheren sensorischen Neuronen exprimiert zu sein und gelten als vielversprechendes Ziel der Schmerztherapie [Waxman and Zamponi, 2014]. Der knock-down des Subtyps Ca<sub>V</sub>3.2 (codiert durch das Gen CACNA1H) führte in einem Modell für neuropathische Schmerzstörung zu einer starken Schmerzlinderung [Bourinet et al., 2005]. Jagodic *et al.* beobachteten eine erhöhte Ca<sub>V</sub>3.2-Aktivität bei diabetischer Neuropathie [Jagodic et al., 2007].

Der Calciumeinstrom führt über die Verschmelzung von Vesikeln mit der Membran zur Ausschüttung von Neurotransmittern, welche ligandengesteuerte Ionenkanäle im nachgeschalteten Neuron aktivieren und damit den Reiz an das ZNS weitergeben. Neben der direkten Projektion sind auch Interneurone beteiligt, die erregend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) sein können.

Insgesamt ist zu betonen dass das Expressionsmuster aus den einzelnen Ionenkanal-subtypen die elektrophysiologischen Eigenschaften der jeweiligen Nervenzelle bestimmt.

### 2.2.3. Testsysteme für das PNS

Für die Schmerzforschung und Erprobung neuer pharmakologischer Substanzen stehen verschiedene tierische *in vivo* Modelle zur Verfügung. Durch Gabe von Substanzen oder durch gezielte Verletzungen lassen sich bestimmte menschliche Krankheitsbilder in Tieren simulieren. Beispielsweise können bei Ratten und Mäusen neuropathische Schmerzstörungen durch Einschnürungen des Ischiasnerven [Bennett and Xie, 1988] oder die Gabe von Acrylamid [Ko et al., 2002] hervorgerufen werden. Für manche Fragestellungen lassen sich statt lebenden Tieren auch primäre tierische Zellen verwenden. Dazu werden DRG-Neurone vor allem aus Ratten isoliert und in Kultur gebracht. Diese Zellen lassen sich über einen längeren Zeitraum in Kultur halten [Biggs et al., 2014], besitzen jedoch keine

Proliferationsfähigkeit und müssen demnach für jedes Experiment frisch isoliert werden [Lindsay, 1988, Haberberger et al., 2020].

Nicht alle DRG-Zellen überleben die Isolation [Lindsay, 1988], außerdem lassen sich gewisse Veränderungen in den dissoziierten, kultivierten Zellen beobachten [Zheng et al., 2007, Genç et al., 2005]. Zudem ist die Gewinnung und Kultivierung von Primärzellen relativ aufwändig und insgesamt mit hohen Kosten verbunden [Haberberger et al., 2020]. Unter Anderem für Hochdurchsatzversuche sind primäre DRG-Zellen daher ungeeignet. Als Alternative zu den primären Zellen stehen induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) zur Verfügung. Diese können aus somatischen differenzierten Zellen durch Zugabe der Transkriptionsfaktoren Myc, Oct3/4, Sox2 and Klf4 (auch Yamanaka-Faktoren genannt) gewonnen werden. iPS können mit Hilfe von bestimmten Faktoren wiederum zu sensorischen Neuronen differenziert werden [Chambers et al., 2016]. Dabei ist es möglich, die Bildung von nozizeptiven oder propriozeptiven Subtypen zu forcieren [Dionisi et al., 2020, Neureiter et al., 2022]. Die Verwendung von iPS hat die Vorteile, dass durch Verwendung von humanen Zellen weder Translationshürden noch ethische Probleme durch Tierversuche entstehen. Die Gewinnung, Kultivierung und Differenzierung der iPS ist aber insgesamt sehr zeit- und kostenintensiv. Als weitere Alternative können immortalisierte Zelllinien verwendet werden. Die aktuell zur Verfügung stehenden Zelllinien wurden entweder erzeugt durch Fusion von DRG-Neuronen mit teilungsfähigen entarteten Zellen (F11 [Platika et al., 1985a], ND7/23, ND-C [Wood et al., 1990]), oder durch Transfektion von DRG-Neuronen mit bestimmten Proteinen, die die Teilungsfähigkeit wieder herstellen (50B11 [Chen et al., 2007], HD10.6 [Raymon et al., 1999], MED17.11 [Doran et al., 2015]). Diese immortalisierten Zellen sind teilungsfähig und weisen gleichzeitig unter Differenzierungsbedingungen bestimmte DRG-Charakteristika auf. [Haberberger et al., 2020].

Die Zelllinie F11 wurde durch chemisch induzierte Zellfusion aus primären embryonalen DRG-Zellen der Ratte und der Mausneuroblastomzelllinie N18TG2 generiert. Beide Chromosomensätze in den Zellen sind aktiv, es werden also sowohl maus- als auch rattenspezifische Proteinisoformen exprimiert. [Platika et al., 1985a, Platika et al., 1985b]. Die Differenzierung kann über direkte oder indirekte intrazelluläre cAMP-Konzentrationserhöhung [Francel et al., 1987], Zugabe von *nerve growth factor* (NGF) [Martin et al., 2002] oder Retinolsäure [Naruse et al., 1992], so wie durch verminderte Serumkonzentration [Pastori et al., 2019] erreicht werden.

Keine der verfügbaren DRG-Zelllinien gleicht exakt den primären DRG-Neuronen und jede hat individuelle Charakteristika, was z.B. das Expressionsprofil von nozizeptionsrelevanten Faktoren angeht [Yin et al., 2016, Haberberger et al., 2020]. Für jede Fragestellung muss deshalb neu evaluiert werden, welche Zelllinie am geeignetsten ist.

Die F11-Zelllinie ist eine der am meisten genutzten DRG-Zelllinien [Haberberger et al., 2020]. Differenzierte F11-Zellen exprimieren viele DRG-relevante Rezeptoren wie TRPV1 [Jahnel et al., 2003, Ambrosino et al., 2013], *Toll-like receptor 4* [Hashemian et al., 2017], Cannabinoid Rezeptor 1 und 2 [Ross et al., 2001, Fioravanti et al., 2008], so wie Opioid Rezeptor Subtypen  $\delta$  and  $\mu$  [Fan et al., 1992, Cruciani et al., 1993]. Es konnte die Expression und Sezernierung der Neurotransmitter Substanz P und *calcitonin gene-related peptide* gezeigt werden [Le Gall-Ianotto et al., 2012], außerdem die Expression von bestimmten Isoformen der *nitric oxide synthase* (NOS) [Rimmerman et al., 2008], welche in nozizeptiven DRG-Neuronen vorhanden sind [Henrich et al., 2002]. Des Weiteren exprimieren F11-Zellen viele wichtige DRG-relevante spannungsgesteuerte Ionenkanäle wie z.B  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L- und N-Typ [Boland and Dingleline, 1990b, Pastori et al., 2019], Tetrodotoxin (TTX)-sensitive  $\text{Na}^{+}$ -Kanäle [Clement et al., 2007, Pastori et al., 2019] und  $\text{K}^{+}$ -Kanäle des Subtyps  $\text{K}_V7$  [Ambrosino et al., 2019].

Bei der Vermehrung der F11-Zellen konnte der Verlust von Chromosomen beobachtet werden, der unter anderem zu einer veränderten Expression von Opioid-Rezeptoren nach Passage 10 führte [Cruciani et al., 1994]. Auch eine veränderte Expression bestimmter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Untereinheiten ab Passage 5 konnte beobachtet werden, welche zum Verlust der Gabapentin-Sensitivität, einem spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-inhibitor, führte [Martin et al., 2002]. Bei der Verwendung dieser Zelllinie ist also die Angabe bzw. Beachtung der Passagenzahl wichtig.

### 2.3. Schweißdrüsen

Die Sekretion von Schweiß ermöglicht dem menschlichen Körper eine effiziente Thermoregulation in Situationen von erhöhter Muskelarbeit oder hohen Umgebungstemperaturen. Menschen werden zusammen mit Pferden und einigen Primatenarten als die einzigen tierischen Lebewesen angesehen, die Schwitzen zur Regulation der Körpertemperatur einsetzen [Bovell, 2018]. Weitere Funktionen des Schweißes sind die Befeuchtung der Haut [Shiohara et al., 2018], sowie Pathogenabwehr [Schröder and Harder, 2006]. Zusätzlich spielen Schweißdrüsen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung der Haut [Biedermann et al., 2010]. Schweißdrüsen wird teilweise auch eine Rolle bei der Detoxifikation nachgesagt, dafür gibt es bislang jedoch keine belastbaren Hinweise [Baker, 2019].

Es gibt zwei Haupttypen von Schweißdrüsen: ekkrine und apokrine. Die Thermoregulation wird hauptsächlich über die ekkrinen Schweißdrüsen realisiert, von denen jeder Mensch etwa 1,6 - 4 Mio. besitzt. Diese sind fast über die gesamte Körperoberfläche verteilt und sind verantwortlich für den größten Teil des sekretierten Schweißvolumens. Ekkrine Schweißdrüsen münden direkt auf der Haut. [Sato et al., 1989] Die größte Dichte kann in Fußsohlen und Handinnenflächen beobachtet werden (ca. 600 - 700 Drüsen/cm<sup>2</sup>), auf der restlichen Körperoberfläche ist die Dichte um das 3- bis 5-Fache geringer [Sato, 1977, Taylor and Machado-Moreira, 2013]. Ekkrine Schweißdrüsen sind etwa ab dem zweiten bis dritten Lebensjahr aktiv, die Anzahl der aktiven Schweißdrüsen sowie ihre Aktivität nimmt danach mit dem Alter ab [Mackinnon, 1954, Inoue and Shibasaki, 1996]. Ekkriner Schweiß besteht hauptsächlich aus Wasser und NaCl, enthält aber auch viele weitere Substanzen wie weitere Elektrolyte (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), Laktat, Ammonium, Harnstoff und Aminosäuren, so wie geringe Mengen an freien Fettsäuren und Steroiden [Takemura et al., 1989, Sato et al., 1989, Sonner et al., 2015]. Thermoregulatorisches Schwitzen wird über cholinerge Nervenfasern des sympathischen Nervensystems und den Neurotransmitter Acetylcholin reguliert. Eine Unterart des thermoregulatorischen Schwitzens ist das gustatorische Schwitzen. Es kann als physiologisches, aber auch als pathologisches Phänomen auftreten. Beide Formen werden letztendlich über die gleichen Signalwege wie thermoregulatorisches Schwitzen ausgelöst. [Wilke et al., 2007]

Neben dem thermoregulatorischen Schwitzen gibt es auch emotionales Schwitzen. Emotionales Schwitzen, ausgelöst durch emotionale Stressreize wie Angst oder Schmerz, wird hauptsächlich über adrenerge Botenstoffe vermittelt und findet neben den ekkrinen auch in apokrinen Schweißdrüsen statt. Emotionales Schwitzen ist beschränkt auf bestimmte Hautareale, dazu gehören Achsel, Stirn, Fußsohle und Handinnenflächen [Asahina et al., 2015].

Apokrine Schweißdrüsen kommen nur in den Bereichen von Achsel, Gesicht, Kopfhaut, Brust sowie Perianal- und Perigenitalbereich vor und werden erst mit der Pubertät aktiv. Der Ausgang der apokrinen Drüsen liegt an Haarfollikeln. Der apokrine Schweiß ist ölig und enthält Proteine, Lipide und Steroide. Der Schweiß an sich ist geruchlos, durch mikrobiellen Abbau auf der Haut kommt es zu einer Geruchsentwicklung. [Labows et al., 1979, Semkova et al., 2015] Apokrine Schweißdrüsen besitzen keine neuronale Innervierung, sondern werden hormonell durch Katecholamine aktiviert [Lindsay et al., 2008].

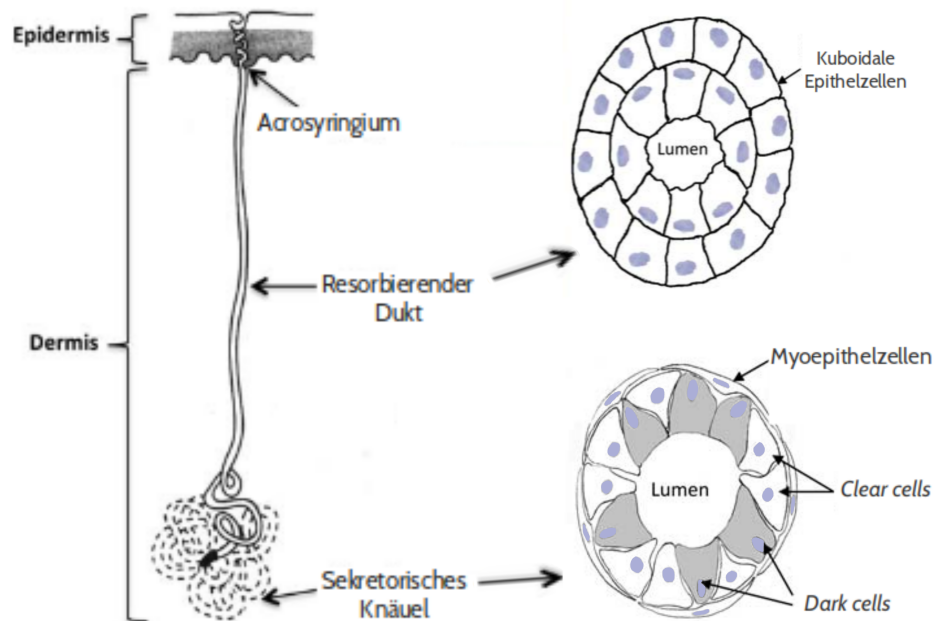
Neben den ekkrinen und apokrine Schweißdrüsen beschreiben Sato *et al.* noch einen dritten Schweißdrüsentyp, den apoekkrinen [Sato and Sato, 1987, Sato et al., 1987]. Die apoekkrinen Schweißdrüsen werden morphologisch als Zwischenform von apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen mit primär thermoregulatorischer Funktion beschrieben. Die Klassifizierung von apoekkrinen Schweißdrüsen als eigener Typ wird jedoch aufgrund von fehlenden spezifischen Markerproteinen und gegensätzlichen Ergebnissen von immunhistochemischen Untersuchungen kontrovers diskutiert [Bovell et al., 2007, Bechara, 2008, Hu et al., 2018].

Diese Arbeit behandelt primär die ekkrine Schweißdrüsenfunktion, da sie die größte Relevanz für Klinik und Forschung besitzen.

### 2.3.1. Aufbau und Funktion

Ekkrine Schweißdrüsen bestehen aus einem sekretorischen Endstück, auch Knäuel genannt, und einem ausführenden Gang, auch Dukt genannt. Das Knäuel sitzt in der unteren Dermis und weist einen Durchmesser von 500 bis 700  $\mu\text{m}$  auf. Es besteht aus einem einzelnen gewundenen Tubus mit einem Durchmesser von 30 bis 50  $\mu\text{m}$ . Im ausgezogenen Zustand hat der Tubus eine Länge von 2 bis 5 mm. [Sato and Sato, 1983b] Das Knäuel weist drei funktionell unterschiedliche Zelltypen auf: *Clear cells*, *dark cells* und Myoepithelzellen. Die *clear* und *dark cells* bilden ein einschichtiges Epithel, welches das Lumen des Tubus umschließt. Die Bezeichnung dieser beiden Zelltypen beruht auf der unterschiedlich starken Färbung der Zellen nach Behandlung mit den Farbstoffen Eosin, Toluidinblau und Methylenblau. Die Myoepithelzellen umschließen die *clear* und *dark cells*. Nach außen hin ist die Schweißdrüse durch eine Basalmembran vom umliegenden Gewebe abgegrenzt.

Im Knäuel wird der primäre Schweiß gebildet, der hauptsächlich aus  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen sowie Wasser besteht. Die Sekretion in ekkrinen Schweißdrüsen kann über die Stimulation von verschiedenen Rezeptortypen geschehen. Die Stimulation aller Rezeptortypen führt letztendlich zu einer Chloridausschüttung aus den sekretorischen *clear cells* in



**Abbildung 2.5.: Aufbau der ekkrinen Schweißdrüse.** Das sekretorische Knäuel sitzt in der Dermis und wird aus einem einschichtiges Epithel aus *clear cells* und *dark cells*, sowie diese umschließende Epithelzellen gebildet. Das Lumen des resorbierenden Dukt wird von einem zweischichtigen Epithel ohne Myoepithelzellen umschlossen. Das ausführende Ende des Dukt, das Acrosyngium, durchzieht die Epidermis und mündet auf der Hautoberfläche. Modifiziert nach [Bovell, 2015]

das Schweißdrüsenlumen.  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}_2\text{O}$  werden elektrochemisch bzw. osmotisch nachgezogen. Die das Knäuel umgebenden Myoepithelzellen pressen den Primärschweiß mittels Kontraktion durch den resorbierenden Dukt, wo ein Großteil der Ionen wieder resorbiert wird, bevor der Schweiß den intraepidermalen Dukt (Acrosyngium) passiert und aus der Duktöffnung austritt. Diese Reabsorption verhindert einen übermäßigen Ionenverlust durch die Schweißsekretion. Der Dukt wird durch ein in größten Teilen zweischichtiges Epithel aus kuboidalen Zellen gebildet. Hier befinden sich keine Myoepithelzellen. [Sato et al., 1989, Bovell, 2015]

Schweißsekretion kann, wie oben beschrieben, sowohl über thermoregulatorische Reize, als auch andere Reize (z.B. Stress) initiiert werden. Bei der thermoregulatorischen Stimulation wird von peripheren Nervenzellen Acetylcholin ausgeschüttet, welches den muskarinen Acetylcholinrezeptor M3 (Genname CHRM3) in den Zellen der Schweißdrüse aktiviert. M3 ist ein G-Protein der Klasse  $G_q$ , die Ligandenbindung führt zur

Aktivierung der membrangebundenen Phospholipase C (PLC). Diese wiederum wandelt Phospholipidphosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) in Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol um. IP<sub>3</sub> bindet am ligandengesteuerten Calciumkanal Inositoltriphosphatrezeptor 2 (ITPR2), der in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) sitzt. Das ER dient als Ca<sup>2+</sup>-speicher, eine Aktivierung von ITPR2 führt zu einer schnellen Diffusion von Ca<sup>2+</sup> ins Cytoplasma. Durch die Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER kommt es zu einer Dissoziation von STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) vom ER. Das freie STIM1 bindet an den cytoplasmamembrangebundenen *calcium release activated calcium channel* ORAI1, was zu einem Einstrom von weiterem Ca<sup>2+</sup> aus dem Extrazellulärraum ins Cytoplasma führt. Durch diesen nachgeschalteten Ca<sup>2+</sup>-Einstrommechanismus kann über einen längeren Zeitraum eine hohe intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aufrecht erhalten werden. Ebenfalls beteiligt an der Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sind spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle (Ca<sub>v</sub>1) [Metzler-Wilson et al., 2014].

In den sekretorischen Zellen der Schweißdrüse, den *clear cells*, führt die erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zur Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Chloridkanälen (CaCC), nämlich Anoctamin (ANO)1, auch TMEM16A (für *trans membrane protein*) genannt. Cl<sup>-</sup> strömt aus der Zelle über die apikale Membran ins Lumen der Schweißdrüse. Die intrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration wird von den Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen (*intermediate conductance* (IK) und *large conductance* (BK)) reguliert [Wilson and Metzler-Wilson, 2015]. Durch die entstehende Elektronegativität im Lumen wird Na<sup>+</sup> transzellulär über tight junctions aus dem Interstitium nachgezogen [Sato, 1977]. Durch die erhöhte Osmolarität wird Wasser über Aquaporin 5 (AQP5) ebenfalls ins Lumen nachgezogen [Nejsum et al., 2002]. Die Lokalisierung von AQP5 ist dynamisch, bei Aktivierung der sekretorischen Zellen kommt es zu einer vermehrten Einlagerung in die apikale Membran [Inoue et al., 2013]. Der so entstandene Primärschweiß wird nun von den Myoepithelzellen, die durch Acetylcholin zur Kontraktion angeregt werden, aus dem Knäuel durch den Dukt an die Hautoberfläche gepresst.

Im Dukt wird über den Chloridkanal *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) und den Epithelialen Natriumkanal (ENaC) Cl<sup>-</sup> und Na<sup>+</sup> aus dem Lumen ins Cytoplasma aufgenommen [Reddy and Quinton, 2003]. Durch ein Zusammenspiel von weiteren Proteinen (V-ATPase, CO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>-Austauscher) gelingt eine sehr effiziente Resorption der Ionen aus dem Schweiß. Die Arbeit von Murphy *et al.* weist zusätzlich auf eine Beteiligung von bestimmten Aminosäuren sowie von K<sup>+</sup> an der Resorption von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> innerhalb des Duktes hin [Murphy et al., 2019].

Neben der cholinergen Stimulation lassen sich Schweißdrüsen auch adrenerg stimulieren. Die Aktivierung des  $\alpha_1$ -Rezeptors führt, wie bei M3 auch, zur Aktivierung der PLC und damit einer erhöhten Calciumkonzentration in den Zellen. Der  $\beta_2$ -Rezeptor hingegen aktiviert bei Ligandenbindung die Adenylatcyclase, was zu einem Anstieg von cAMP in der Zelle führt. cAMP aktiviert den Chlorid-Kanal CFTR in den *clear cells*, was zu einem Ausstrom von  $\text{Cl}^-$  ins Lumen führt [Sato and Sato, 1984].

Der Effekt der adrenergen Stimulation von Schweißdrüsen ist, gemessen an dem sekretierten Schweißvolumen, wesentlich geringer als der der cholinergen und spielt bei der Thermoregulation eine untergeordnete Rolle [Sato and Sato, 1984]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zwischen cAMP- und calciumgesteuertem Signalweg eine synergistische Beziehung besteht [Sato and Sato, 1983a].

Die Triebkraft hinter der Schweißsekretion sind elektrochemische Gradienten, die von den sekretorischen Schweißdrüsenzellen aufgebaut werden. Zentral ist dabei die Akkumulation von  $\text{Cl}^-$  im Cytoplasma der *clear cells*. An dem Aufbau des Gradienten sind mehrere Iontentransporter beteiligt: Die Na-K-ATPase pumpt unter ATP-Verbrauch  $\text{Na}^+$  über die Plasmamembran aus der Zelle ins Interstitium und  $\text{K}^+$  aus dem Interstitium in die Zelle hinein. Der durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC) 1 transportiert  $\text{Cl}^-$  aus dem Interstitium in die Zelle hinein und wird durch den Cotransport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  angetrieben. Weiterhin sind auch der  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -*exchanger* (NHE)1, die Carbonic Anhydrase (CA)2,  $\text{CO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher sowie der  $\text{H}^+$ -Transporter V-ATPase am Aufbau der Gradienten beteiligt. [Sato et al., 1989, Clunes et al., 2004, Nejsum et al., 2005, Louie et al., 2016].

Die *dark cells* sind nach aktuellem Wissenstand nicht direkt an der Produktion des Primärschweißes beteiligt, scheinen aber dennoch unentbehrlich für die Schweißsekretion zu sein [Cui et al., 2012]. Vermutlich sind die *dark cells* über gap junctions mit den *clear cells* verbunden und sind beteiligt am Aufbau von Ionengradienten sowie der pH-Regulation im Schweißdrüsenlumen [Cui and Schlessinger, 2015]. Zusätzlich sezernieren die *dark cells* Makromoleküle wie das antimikrobielle Peptid Dermicidin und tragen damit zu einer Regulation des Mikrobioms der Haut bei [Quinton, 1983, Schitteck et al., 2001].

Neben emotionalem Stress und erhöhter Haut- und Körpertemperatur haben auch Blutdruck und Metabolismus einen Einfluss auf die Schweißsekretion [Shibasaki and Crandall, 2010]. Schon in den 60er Jahren beschrieben Van Beaumont und Bullard eine schnell eintretende Schweißsekretion bei körperlicher Anstrengung der Probanden, die zeitlich vor einem Anstieg der Körpertemperatur lag [Van Beaumont and Bullard, 1963, Van Beaumont and Bullard, 1966]. An diesem Phänomen sind zum Einen Baro-

zereptoren beteiligt, die sowohl auf Erhöhung als auch auf Verringerung des Blutdrucks reagieren [Lynn et al., 2012]. Zum Anderen spielen dabei auch Metaborezeptoren eine Rolle, die unabhängig von erhöhtem Blutdruck auf muskuläre Aktivität reagieren [Shibasaki et al., 2001].

Der bei der ekkrinen Schweißsekretion wichtigste Neurotransmitter Acetylcholin wird in den Synapsen schnell durch die Acetylcholinesterase abgebaut. Dadurch kann die Aktivität der Schweißdrüsen zeitlich genau reguliert werden [Longmore et al., 1986, Shibasaki and Crandall, 2001]. Weiterhin gibt es viele Moleküle, für die ein modulatorischer Effekt auf die Schweißdrüsenfunktion gezeigt wurde. Dazu zählen Galanin [Bovell et al., 2013a], *vasoactive intestinal peptide* (VIP) [Yamashita et al., 1987], *Calcitonin-gene related peptide* (CGRP) und Substanz P [Kumazawa et al., 1994], Stickstoffmonoxid (NO) [Lee and Mack, 2006], Purintriphosphate [Wilson et al., 1994], *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) [Cui and Schlessinger, 2017], Histamin [Matsui et al., 2014], sowie bestimmte Serinproteasen [Bovell et al., 2009]. Funktion und physiologische Relevanz dieser Modulatoren ist in vielen Fällen noch nicht eindeutig geklärt [Cui and Schlessinger, 2015, Hu et al., 2018].

### 2.3.2. Schweißdrüsen-assoziierte Krankheiten

Es gibt eine Reihe von Krankheiten, die die ekkrinen Schweißdrüsen betreffen und ihre Aktivität und Funktion deregulieren. Übermäßige Schwitzen (Hyperhidrose) und stark unangenehm riechender Schweiß (Bromhidrose) sind physiologisch ungefährlich, können aber starke soziale Einschränkungen und in Folge dessen psychische Krankheiten für die Betroffenen bewirken [Semkova et al., 2015]. Bei Hypo- und Anhidrose (verringerte bzw. fehlende Schwitzfähigkeit) fehlt mit dem Schwitzen ein wichtiger Mechanismus der Thermoregulation. Dies führt zu geringerer körperlicher Leistungsfähigkeit und unter Umständen zu Überhitzungen, die lebensgefährlich sein können. [Quinton, 1983, Gauer and Meyers, 2019].

Eine prominente Erkrankung, die zu Hypo- bzw Anhidrose führt, ist die Cystische Fibrose. Bei dieser angeborenen, genetisch bedingten Krankheit ist durch Mutation der Ionenkanal CFTR in seiner Funktion gestört. Dieser Kanal ist neben anderen epithelialen Geweben auch in Schweißdrüsen exprimiert. Es kommt zu einer verminderten Schweißsekretion sowie einer verringerten Resorption von Chlorid und Natrium [di Sant'Agnese et al., 1953, Saint-Criq and Gray, 2017, Quinton, 2007].

Neben den Störungen der Schweißdrüsenfunktion stellt auch das Fehlen von Schweißdrüsen durch tiefe Verletzungen der Haut ein medizinisch relevantes Problem dar. Schweiß-

drüsen können, wie andere Hautanhangsorgane auch, nicht regenerieren [Rittié, 2016], was bei Verletzungen unter anderem zu einer lokalen Anhidrose führt. Der Goldstandard bei der Therapie von großflächigen Hautverletzungen ist die autologe Transplantation, bei der körpereigene, gesunde Haut auf die Wunde aufgebracht wird [Weng et al., 2020]. Nachteil bei dieser Methode ist die limitierte Spenderfläche und die sekundären Verletzungen an der Entnahmestelle [Berthiaume et al., 2011]. Alternativ zur autologen Transplantation ist die nachgezüchtete Haut (*tissue engineered skin*, TES), bei der Zellen in Kombination mit synthetischen oder natürlichen Matrices und löslichen Faktoren zu neuer Haut bzw. hautartigem Gewebe gezüchtet werden. Dabei ist jedoch nach wie vor die Neubildung von Gefäßen, Nerven, und Hautanhangsorganen wie Schweißdrüsen eine große Herausforderung [Weng et al., 2020]. Für Schweißdrüsen konnte bereits in einem humanen Transplantationsversuch mit autologen Stammzellen aus dem Knochenmark eine Neubildung von Schweißdrüsen beobachtet werden [Sheng et al., 2009]. Die Gewinnung dieser Zellen ist jedoch mit einem relativ stark invasivem Eingriff und damit Stress für Patient:innen verbunden. Zudem zeigt diese Methode, bezogen auf die resultierende Dichte der Schweißdrüsen und der Wiederherstellung der Haut, noch großen Optimierungsbedarf.

### 2.3.3. Modelle der Schweißdrüsenforschung

Für die Erforschung der Schweißdrüse wurden und werden verschiedene Tierarten herangezogen, unter anderem Mäuse, Ratten, Pferde und Affen [Sato and Sato, 1981, Michiak-Mikolajczak, 1984, Bovell et al., 2013b, Klar et al., 2014]. Um allerdings Erkenntnisse über Physiologie der menschlichen Schweißdrüse und Wirkung von Substanzen auf eben jene zu gewinnen, sind tierische Schweißdrüsen aufgrund von Unterschieden zur menschlichen Physiologie nur bedingt geeignet. Eine Ausnahme stellen Affen dar, deren Nutzung allerdings durch ethische Aspekte stark in den Hintergrund gerückt ist. [Bovell, 2018] Um die Schweißsekretion zu untersuchen, können Schwitzversuche direkt am Menschen durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind direkt verwertbar, allerdings sind solche Versuchsreihen aufwendig und kostenintensiv. Außerdem müssen verwendete Substanzen als sicher eingestuft sein und bedingen vorangehende Toxizitätsstudien.

Eine weitere Möglichkeit ist die Isolation von Schweißdrüsen aus Spenderhaut, die durch Biopsien gewonnen wird oder bei chirurgischen Eingriffen anfällt. Das Sekretionsvolumen und die Schweißzusammensetzung von einzelnen Schweißdrüsen kann z.B. durch Einsaugen des Drüsenausgangs in eine Kapillare analysiert werden [Sato and Sato, 1983b, Michiak-Mikolajczak, 1984, Sato and Sato, 1983b, Quinton and Reddy, 1992]. Die

hohe Variabilität der Schweißdrüsenfunktion zwischen den Spender:innen schränkt dabei die Vergleichbarkeit von Ergebnissen ein [Sato and Sato, 1983b].

Weiterhin können Schweißdrüsen auch dissoziiert werden, um Experimente an einzelnen Zellen durchzuführen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Schweißdrüse aus verschiedenen Zelltypen besteht, die bei solchen Experimenten nicht immer zweifelsfrei voneinander unterschieden werden können.

Um Experimente mit hohem Durchsatz und guter Vergleichbarkeit an definierten Zellpopulationen durchzuführen, bietet sich die Verwendung von Zelllinien an. Die einzige bisher immortalisierte Schweißdrüsenzelllinie ist NCL-SG3. Sie wurde 1989 durch Transfektion von humanen Zellen des Schweißdrüsenknäuels mit dem viralen Protein *SV40 large tumor antigen* etabliert. [Lee and Dessi, 1989] Diese Zelllinie war und ist ein wichtiges Werkzeug in der Forschung, was die Signalverarbeitung in ekkrinen Drüsen angeht, zum Beispiel die Funktionen von ligandengesteuerten  $K^+$  - und  $Cl^-$ -kanälen, sowie die Aktivierung der Oxytocin-, Östrogen-, Galanin- und Protease aktivierte Rezeptoren [Mork et al., 1996, Servetnyk and Roomans, 2007, Bovell, 2018]. NCL-SG3 ist jedoch limitiert in der Anwendung, da sie nicht auf physiologischem Weg stimuliert werden kann, weder über den cholinergen noch über den adrenergen Weg [Lee and Dessi, 1989, Bovell, 2018].

Bei der Kultivierung von primären Schweißdrüsenzellen besteht das Problem, dass sich der Phänotyp in der klassischen 2D-Kultur schnell verändert und die Zellen dedifferenzieren [Klaka, 2017]. Um das Problem zu umgehen, wurden Stammzellen des Fruchtwassers [Liang et al., 2016] sowie reprogrammierte Epithelzellen [Yao et al., 2019] und Fibroblasten [Zhao et al., 2015] zu Schweißdrüsenzellen differenziert. Für die beiden erstgenannten konnte über Ca-Imaging eine cholinerge Stimulation gezeigt werden. Eine andere Möglichkeit zeigten Klaka *et al.* mit der 3D-Kultivierung von primären, dedifferenzierten Schweißdrüsenzellen in Sphäroiden, was eine Redifferenzierung der Zellen zur Folge hatte [Klaka et al., 2017]. Auch diese Zellen zeigten eine Empfänglichkeit für cholinerge Stimulation.

### **Humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (hSGSC)**

Im Jahr 2006 konnten Kruse *et al.* zum ersten Mal Nestin-positive Zellen in der Peripherie der Schweißdrüse zeigen [Kruse et al., 2006]. Für diese Zellpopulation wurde 2010 von Petschnik *et al.* eine Explant-Kultur-basierte Methode entwickelt, um sie zu isolieren und zu kultivieren [Petschnik et al., 2010]. Es wurde gezeigt, dass diese Zellen einen positiven Effekt auf die Regeneration von Haut [Liao et al., 2019], Blutgefäßen [Danner et al., 2012] und peripheren Nerven [Mehnert et al., 2014] haben.

In den Zellen konnte weiterhin der Stammzellmarker Nestin sowie die Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren NANOG, OCT4, SOX2, KLF4 und Nucleostemin auf mRNA-Ebene und Nestin, NANOG, OCT4 und SOX2 ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde für die Zellen ein spontanes Differenzierungspotential in alle Keimblätter festgestellt [Petschnik et al., 2010, Nagel, 2013]. Dieser Zelltyp wird daher als humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (*human sweat gland derived stem cells*, hSGSCs) bezeichnet. Die Existenz dieser Stammzellpopulation wurde 2018 von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, dabei wurde die Expression einiger typischer mesenchymaler Stammzellmarker gezeigt [Ma et al., 2018]. hSGSCs lassen sich sowohl aus ekkrinen als auch apokrinen Schweißdrüsen gewinnen [Nagel, 2013]. Während der Isolation ist eine eindeutige Klassifizierung der Schweißdrüsen als ekkrin oder apokrin nicht ohne weiteres möglich [Lonsdale-Eccles et al., 2003, Petschnik, 2011]. Zudem existiert eine interindividuelle Variabilität bezüglich der Aktivität der Schweißdrüsen [Sato and Sato, 1983b]. Die gewonnenen hSGSC-Linien müssen demnach einzeln charakterisiert werden bezüglich Expressionsprofil und Differenzierungspotential.

Für die Schweißdrüsenforschung stellen hSGSCs insgesamt einen vielversprechenden Zelltyp dar. Daneben sind sie auch für die Regenerative Medizin von großem Interesse. Für hSGSCs konnte bereits gezeigt, dass sie die epitheliale Wundheilung der Haut und die Regeneration von peripheren Nervenzellen unterstützen können [Liao et al., 2019, Mehnert et al., 2014]. Ebenfalls konnte ein neuronales Differenzierungspotential dieser Zellen nachgewiesen werden [Petschnik et al., 2011]. Diese Eigenschaften sprechen dafür, dass hSGSCs in der Therapie von großflächigen Wunden eingesetzt werden können. Möglicherweise können hSGSCs darüber hinaus auch für die *de novo*-Regeneration von Schweißdrüsen genutzt werden. Die relativ einfache Gewinnung und Kultivierung der hSGSCs stellt einen Vorteil gegenüber anderen Stammzelltypen dar, die für die Schweißdrüsenregeneration propagiert wurden [Sheng et al., 2009, Weng et al., 2020].

### 2.4. Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, für zwei verschiedenen Zelltypen - die immortalisierte neuronale Zelllinie F11 und humane Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen (hSGSCs) - eine Sphäroidkultur zu etablieren und deren Wirkung auf die Differenzierung und elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen zu untersuchen.

Für hSGSCs galt es zuerst, das Differenzierungspotential zu sekretorischen Schweißdrüsenzellen für drei verschiedene hSGSC-Linien anhand von bestimmten Markern zu untersuchen. Besonderes Augenmerk lag auf der Expression des muskarinen Acetylcho-

linrezeptors M3 (CHRM3).

Sowohl für hSGSCs als auch F11-Zellen sollte dann mittels RT-qPCR analysiert werden, ob die Kultivierung in Sphäroiden einen Einfluss auf das mRNA-Expressionsprofil von ausgewählten Markern für Differenzierung und Funktion hat. Auch alternative Kulturmedien sollten in Bezug auf eine verbesserte Differenzierung getestet werden. Weiterführend sollte die Funktionalität der Sphäroid-Zellen mittels automatisiertem Patch-Clamping und im Falle der hSGSCs auch mit Calcium Imaging untersucht werden. Dabei galt es für das automatisierte Patch-Clamping die Frage zu klären, in wie weit sich diese Methode für die Untersuchung von multizellulären Sphäroiden eignet.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethan-sulfonsäure (HEPES)	Roth, Deutschland
3,3',5-Triiodo-L-thyronin Natriumsalz (T3)	Sigma-Aldrich, Deutschland
4,9-Anhydrotetrodotoxin (ahTTX)	Biotechne, England
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Roche, Schweiz
Accutase	Innovative Cell Technologies, USA
Aceton	Roth, Deutschland
Acetyl- $\beta$ -methylcholinchlorid (MCH)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Österreich
Calciumchlorid	Merck, Deutschland
CellTak	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
Collagenase NB8	Nordmark Biochemicals, Deutschland
D(+)-Glukose	Roth, Deutschland
Dispase II	Roche, Schweiz
DMEM/F12-Medium	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Deutschland
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Österreich
Fluo-4 AM	AAT Bioquest, USA

Fluorescein-Diacetat (FDA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Fura Red AM	AAT Bioquest, USA
HAT Supplement	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
HEPES	Roth, Deutschland
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
Hydrokortison	Sigma-Aldrich, Deutschland
Insulin-Transferrin-Selenium 100x (ITS)	Gibco, Deutschland
Ionomycin Calciumsalz	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Deutschland
eShell	Envisiontec, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories, Österreich
Magnesiumchlorid	Roth, Deutschland
N <sub>6</sub> ,2'-O-Dibutyryladenodin-3',5'-zyklisches Monophosphat Natriumsalz (db-cAMP)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Deutschland
Penicilin/Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich
Pluronic F-127	AAT Bioquest, USA
Sylgard 184	Dow, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Deutschland
QIAXcel Alignment Marker 15 bp/500 bp	Qiagen, Deutschland
QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII	Qiagen, Deutschland
Rekombinantes humanes <i>epithelial growth factor</i> (rhEGF)	Lonza, Schweiz
TE-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
TRIZol	Thermo Fisher Scientific, Dänemark

Trypsin	PAA Laboratories, Österreich
VeroBlack	Objet Geometries, Israel

### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> und 175cm <sup>2</sup> )	TPP, Schweiz
ibidi $\mu$ -Dish, 35 mm (high)	ibidi, Deutschland
serologische Pipetten 2, 5, 10 und 25 mL	VWR, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 und 2,0 mL	Sarstedt, Deutschland
Petrischale (quadratisch)	Roth, Deutschland
Petrischale (rund), bakteriologische Schale	Roth, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5-10, 10-100 und 100-1000 $\mu$ L	Sarstedt, Deutschland
Flaschenaufsatzfilter PES Steritop 0,2 $\mu$ m	Merck, Deutschland
Spritzenfilter Minisart Porengröße 0,20 $\mu$ m CA-Membran	Sartorius, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 mL	Sarstedt, Deutschland
Nucleo Cassette	Chemometec, Dänemark
PCR-Platten Hard-Shell 96-well, clear well, white shell	Bio-Rad, USA

### 3.1.3. Primer

**Tabelle 3.3.: Verwendete Primer für F11-Zellen.** Für Tubb3, Kcnd3 und Ntrk3 wurden Primerpaare der Firma Qiagen verwendet. Die Sequenzen für diese Primer ist nicht bekannt, statt dessen wurde die Produkt-ID angegeben. Für weitere Informationen zu den Primern siehe Tabelle A.2.

Genname	for/rev	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	SYBR-Mix
Cacna1h	forward	TCTACTTCATCCTCCTCATCATTGT	SensiFast
	reverse	TCGTTGGACAGATAGCGGG	

Tabelle 3.3.: Verwendete Primer für F11-Zellen. (Fortsetzung)

Genname	for/rev	Sequenz (5'→3')	SYBR-Mix
Canx	forward	CTGGCTAGACGACGAACCTG	QuantiFast
	reverse	CGTCCATATCCTCATCCCAATCC	
Capn10	forward	TCGTGAGATCCACTTGCGTTG	QuantiFast
	reverse	ACGGCACTGAGGGAGATTTTC	
Gapdh	forward	AACTGAGGACCAGGTTGTC	SensiFast
	reverse	GTCATTGAGAGCAATGCCAGC	
Hcn2	forward	GGCGTCAACAAGTTCTCCCTG	SensiFast
	reverse	CCATGAACAACAGCATGGTGAAG	
Kcnk3	forward	CAAGGTGTTCTGCATGTTCTAC	SensiFast
	reverse	GACACGAAACCGATGAGCAC	
Kcnq2	forward	AGAAGGTCAGTTTGAAAGATCGTG	QuantiFast
	reverse	GTCATCAAGACTCTGATCCGC	
Nefm	forward	TTAGCACATTTTCAGGAAGCATCAC	SensiFast
	reverse	ATTTGTGTTGGACCTTGAGCTTG	
Ppib	forward	TCCACACCCTTTTCCGGTC	SensiFast
	reverse	GCACCTTCATATTGCGCTCC	
Prph	forward	GTGACCTGGACAAGTCTTCTATC	SensiFast
	reverse	GCCAAGCTTAGGAATAGGCTG	
Rpl13a	forward	GGATGGTGGTCCCTGCTG	SensiFast
	reverse	CTGTCACTGCCTGGTACTTCC	
Scn8a	forward	GCCTGAAGACAATCGTGGGC	QuantiFast
	reverse	AGTTTATGGGCCACACGACAC	
Syn1	forward	GCATGGCACGTAATGGAGAC	SensiFast
	reverse	CTTCTTGTGTAGTCGAACCATCTG	
Syp	forward	AGACATGGACGTGGTGAATCAG	SensiFast
	reverse	CAAAGGCGAAGATGGCAAAGAC	
Syt1	forward	TCACCACTGTTGCGACCC	SensiFast

**Tabelle 3.3.: Verwendete Primer für F11-Zellen.** (Fortsetzung)

Genname	for/rev	Sequenz (5'→3')	SYBR-Mix
	reverse	CATTCATAAACTTCTGCTTCAGCTTG	
Tubb3	Paar	Mm_Tubb3_1_SG (Qiagen, QT00124733)	SensiFast
Kcnd3	Paar	Mm_Kcnd3_vb.1_SG (Qiagen, QT01160999)	QuantiFast
Ntrk3	Paar	Mm_Ntrk3_1_SG (Qiagen, QT00146153)	SensiFast

**Tabelle 3.4.: Verwendete Primer für hSGSCS.** Sämtliche Primerpaare wurden von Qiagen bezogen, die Sequenzen sind nicht bekannt.

Genname	Produkt-ID
ANO1	Hs_ANO1_1_SG (Qiagen, QT00076013)
AQP5	Hs_AQP5_1_SG (Qiagen, QT00036099)
CAPN10	Hs_CAPN10_1_SG (Qiagen, QT00204911)
CFTR	Hs_CFTR_1_SG (Qiagen, QT00070007)
CHRM3	Hs_CHRM3_1_SG (Qiagen, QT00200354)
ITPR2	Hs_ITPR2_1_SG (Qiagen, QT00230062)
ORAI1	Hs_ORAI1_2_SG (Qiagen, QT01870043)

### 3.1.4. Kits

DirectZol	ZymoResearch, USA
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Deutschland
Quantitect Reverse Transcription	Qiagen, Deutschland
RNA XS	Macherey-Nagel, Deutschland
RNeasy Mini	Qiagen, Deutschland
SensiFast SYBR Green PCR Kit	Bioline, USA

### 3.1.5. Geräte

Brutschrank	Binder, Deutschland
Clean Bench NU-480	Nuaire, USA
Einfrierbehälter CoolCell	Biocision, USA
Kapillargelelektrophorese QIAxcel	Qiagen, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Zeiss Axio Vert.A1	Zeiss, Deutschland
Nanodrop-Spektrophotometer ND-1000	PeqLab, Deutschland
Patch-Clamping Automat CytoPatch	Cytocentrics, Deutschland
PCR-Cycler C1000 Touch CFX96	Bio-Rad, USA
Pipette Research plus 10 µL	Eppendorf, Deutschland
Pipette Research plus 100 µL	Eppendorf, Deutschland
Pipette Research plus 1000 µL	Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfe Peqmate	Peqlab, Deutschland
Thermocycler Mastercycler	Eppendorff, Deutschland
Tischzentrifuge	Kisker Biotech, Deutschland
Waage Kern ABT 220-5DM	Kern & Sohn, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Deutschland
Zellzählgerät Nucleocounter	Chemometec, Dänemark

#### 3.1.6. Software

CFX Manger 2.1	BioRad, USA
CytoLogic	CytoBioscience, USA
Excel 2010	Microsoft, USA
ND-1000 V3.5.2	NanoDrop Technologies, USA
Prism 5.04	GraphPad Software, USA
Zen 2.1 (black edition)	Zeiss, Deutschland
Zen 2.6 (blue edition)	Zeiss, Deutschland

### 3.1.7. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

F11-Proliferationsmedium  
(„DMEM“)

DMEM  
FKS (1 %)  
Penicillin (1 U/mL)  
Streptomycin (0,5 mg/mL)

F11-Differenzierungsmedium  
(„DMEM<sup>+</sup>“)

DMEM  
Penicillin (1 U/mL)  
Streptomycin (0,5 mg/mL)  
FKS (1 %)  
Natrium-Hypoxanthin (5 mM)  
Aminopterin (20  $\mu$ M)  
Thymidin (0,8 mM)  
db-cAMP (0,5 mM)

hSGSC-Proliferationsmedium  
(„DMEM“)

DMEM  
FKS (10 %)  
Penicillin (1 U/mL)  
Streptomycin (0,5 mg/mL)

hSGSC-Differenzierungsmedium („DMEM/F12 <sup>+</sup> “, nach [Sheng et al., 2009] und [Gao et al., 2014])	DMEM/F12 FKS (5 %) Penicillin (1 U/mL) Streptomycin (0,5 mg/mL) Hydrocortison (0,4 mg/mL) T3 (1,35 mg/mL) L-Glutamin (2 mM) Insulin (1 mg/mL) Tranferrin (9,55 mg/mL) Natrium-Selenit (9,67 mg/mL) rhEGF (10 µg/mL)
Patch-Clamping-Puffer, extrazellulär (nach [Kusano and Gainer, 1993])	NaCl (140 mM) KCl (4,7 mM) MgCl <sub>2</sub> (1,0 mM) Glucose (10 mM) HEPES (10 mM) pH = 7,4
Patch-Clamping-Puffer, intrazellulär (nach [Kusano and Gainer, 1993])	KCl (150 mM) MgCl <sub>2</sub> (2,2 mM) HEPES (5 mM) pH = 7,3
Calcium-Imaging Messpuffer (nach [Klar et al., 2014])	NaCl (140 mM) KCl (5,4 mM) MgCl <sub>2</sub> (1,0 mM) CaCl <sub>2</sub> (2,0 mM) Glucose (10 mM) HEPES (20 mM) pH = 7,42

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. 2D-Zellkultur

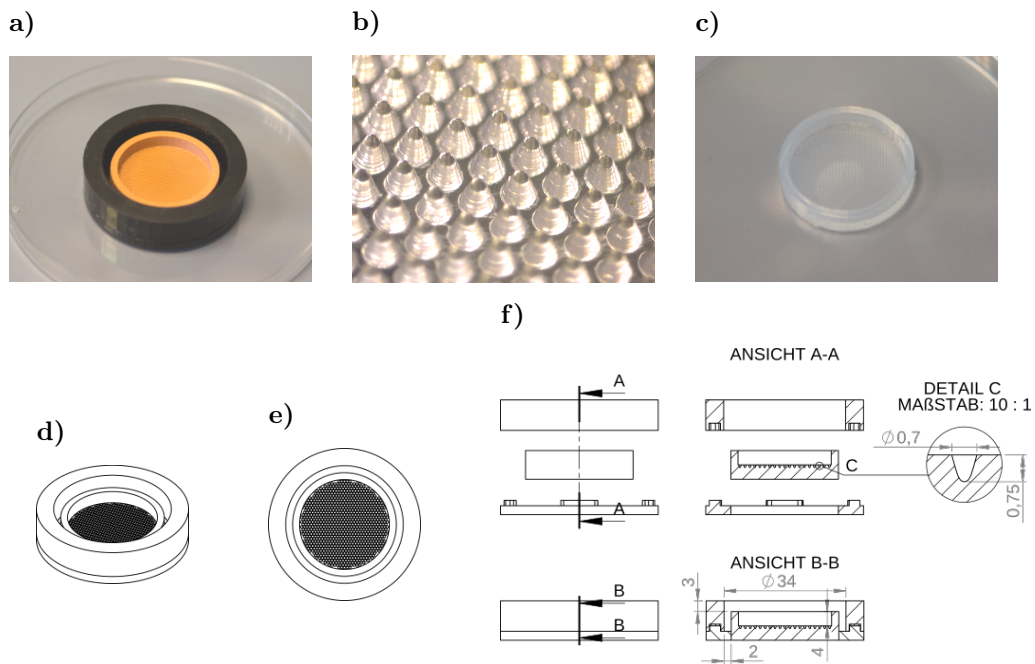
Die neuronalen F11- Zellen wurden kommerziell erworben und als Passage 15-20 verwendet. Die humanen Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen (hSGSCs) wurden als etablierte Zelllinien aufgegriffen und als Passage 7-11 verwendet. Das Isolationsverfahren der hSGSCs ist in [Petschnik et al., 2010] näher beschrieben. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist im Abschnitt 3.1.7 beschrieben. Die Kryokonservierung der Zellen wurde in 90 % fötalem Kälberserum (FKS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Gefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C angetaut und in Kulturflaschen aus Polypropylen in Kultur genommen. Das entsprechende Medium wurde vor der Nutzung im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriert. Ein Mediumwechsel wurde am Tag nach der Passage und sonst alle zwei bis drei Tage durchgeführt.

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen enzymatisch abgelöst (F11-Zellen mit *Accutase*, hSGSCs mit Trypsin/EDTA) und erneut in Plastikflaschen ausgesät. F11-Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät, was beim Splitten etwa einem Verhältnis von 1:10 entsprach. Die hSGSCs wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät, was beim Splitten einem Verhältnis von etwa 1:3 entsprach.

### 3.2.2. 3D-Zellkultur

Für die 3D-Zellkultur wurden Mikromulden aus Agarose verwendet. Die Herstellung der Mikromulden erfolgte in einer Gussform aus Sylgard 184 (Polydimethylsiloxane, PDMS), die wiederum mit einer Gussform aus Hartplastik nach eigenen Konstruktionsplänen hergestellt wurde (siehe Abbildung 3.1). Das Design der Mikromulden wurde der *3D-Petridish* der Firma *MicroTissues* nachempfunden. Die Anzahl der Kavitäten wurde dabei an den erhöhten Bedarf an Sphäroiden angepasst und auf 913 erhöht. Für die Herstellung des PDMS wurden Base und *curing agent* im Verhältnis 15:1 (v/v) gründlich gemischt und in einer Vakuumkammer entgast. Die verhältnismäßig geringe Konzentration des Curing Agents sorgte für eine hohe Flexibilität, die von Vorteil für das spätere Herauslösen der Agaroseformen war. Das PDMS wurde für 24 h bei 40 °C gehärtet. Für die Herstellung der Agarose-Mikromulden wurde PBS mit 2 % Agarose versetzt und in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht. Die noch heiße Agarose wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Pipette in die PDMS-Abdrücke gegeben, etwaige Luftblasen wurden direkt entfernt. Nach dem Abkühlen wurde die Agaroseformen vorsichtig ausgelöst und

entweder direkt verwendet oder bis zu 14 Tage mit PBS überschichtet bei 4°C gelagert. Die PDMS-Formen wurden nach jeder Benutzung im Autoklav sterilisiert und wieder verwendet. Vor dem Einbringen von Zellen wurden die Mikromulden in Petrischalen mit dem entsprechenden Medium für mindestens 2 h bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C äquilibriert. Für das Aussäen wurden 1 mL der Zellsuspension mit entsprechender Konzentration in jede Mikromuldenform gegeben. Das Medium wurde 24 h nach Aussaat und danach alle zwei bis drei Tage gewechselt. Für den Mediumwechsel wurde das alte Medium innerhalb und außerhalb der Mikromuldenform vorsichtig abgesaugt, das frische Medium wurde langsam in die Mikromuldenform gegeben. Das Ernten der Sphäroide erfolgte kopfüber in Round-Bottom 6-Well-Platten mit einer Plattenzentrifuge bei bis zu 100 x g für 1 min. Die Sphäroide wurden in einem 15 mL Plastikröhrchen gesammelt und bei 100 x g pelletiert. Das Pellet wurde entweder für die RNA-Isolation in Lysepuffer aufgenommen oder für eine weitere Verwendung der Sphäroide in Medium aufgenommen.



**Abbildung 3.1.: Produktion der Mikromulden.** Mittels 3D-Druck wurden aus den Materialien *eShell* und *VeroBlack* Vorlagen für die Mikromulden gefertigt (a). Mit PDMS wurde ein Abdruck davon gemacht (b, Nahaufnahme), von diesem wurde wiederum ein Abdruck mit 2 % Agarose in PBS gemacht (c). Die Konstruktionszeichnungen sind in d, e und f dargestellt, Maßangaben sind in mm.

### 3.2.3. Isolation von humanen Schweißdrüsen

Für den Expressionsvergleich der hSGSCs mit nativem Gewebe wurden Schweißdrüsen aus der menschlichen Haut isoliert. Dazu wurden Hautspenden aus dem Universitätsklinikum Schleswig Holstein in Lübeck von Subkutanfett befreit und in kleine, etwa 2 mm x 2 mm große Stücke zerschnitten. Die Stücke wurden über Nacht in Dispase II verdaut, um die Basallamina zwischen Epidermis und Dermis aufzulösen. Im Anschluss wurde die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis entfernt. Die Dermis wurde dann mit einer Schere gründlich zerkleinert, mit Digestionsmedium versetzt und für 3 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Das Digestionsmedium enthielt Kollagenase IV und wurde direkt vor dem Verdau 30 s mit 5 % CO<sub>2</sub> begast. Der Verdau wurde mit dem doppelten Volumen DMEM mit 1 % P/S und 20 % FKS abgestoppt und mit Neutralrot für 2 min inkubiert. Im Anschluss wurden unter der Sterilbank mit Hilfe eines Mikroskopes die nun rot gefärbten ekkrinen Schweißdrüsen vorsichtig mit einer Pipette mit einer abgeschnittenen Spitze in PBS überführt. Nach Zentrifugation bei 100 x g wurde das Pellet in TRIzol lysiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die lysierten Schweißdrüsen bei -80 °C gelagert.

Die Schweißdrüsen, aus denen die in dieser Arbeit verwendeten hSGSC-Linien entstanden sind, wurden nach dem selben Protokoll isoliert und auf Kollagen-beschichtete Platten aufgekrazt. Die Herstellung der hSGSC-Linien wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

### 3.2.4. Vitalitätsfärbung

Um den Anteil der lebenden Zellen zu untersuchen, wurden FDA/PI-Cofärbungen durchgeführt. Fluorescein-Diacetat (FDA) ist membrangängig und wird von lebenden Zellen enzymatisch gespalten. Das entstehende Fluorescein ist nicht membrangängig und im Gegensatz zum FDA fluoreszent. Propidiumiodid (PI) durchdringt die Membran von toten Zellen und lagert sich an DNA an, gelangt jedoch nicht durch die Membran von lebenden Zellen. Zur Herstellung einer Stocklösung wurde FDA in einer Konzentration von 3 mg/mL in Aceton gelöst und bei -20 °C gelagert. PI wurde in einer Konzentration von 2 mg/mL in PBS gelöst und bei 4 °C gelagert. Für die Färbung wurden die Zellen und Sphäroide 5 min mit FDA in einer Konzentration von 1,5 µg/mL in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde PI in einer Konzentration von 2 µg/mL dazugegeben und für 1 min inkubiert. Direkt im Anschluss wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) Aufnahmen der gefärbten Zellen und Sphäroide gemacht.

#### 3.2.5. RNA-Isolation

Um die Genexpression der Zellen auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde zunächst die gesamte RNA aus den Zellen isoliert. Dafür wurden säulenbasierten Kits benutzt, in denen die mRNA vorübergehend an ein Silikatgel gebunden wird. Für die Analyse der F11-Zellen wurde das Kit *RNeasy Mini* von Qiagen verwendet, für die hSGSCs wurde das Kit *RNA XS* von Macherey-Nagel benutzt. Die Zellen wurden in den zu den Kits gehörenden Lysepuffern resuspendiert, durch mehrmaliges Aufnehmen durch eine Kanüle oder durch starkes Schütteln mit einem Vortexer aufgeschlossen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zum Schutz der RNA wurden dem Lysepuffer 10 mM Tris(2-Carboxyethyl)-Phosphin (TCEP) zugesetzt. Das Lysat wurde nach dem Auftauen auf die den Kits zugehörigen Säulen gegeben, die Waschschrte wurden nach Protokoll der Hersteller durchgeführt. Beide Kits verfügen über einen Mechanismus zur Eliminierung der genomischen DNA. Eluiert wurde die RNA mit nukleasefreiem Wasser. Direkt im Anschluss an die Isolation erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA.

Die RNA-Isolation der ganzen Schweißdrüsen wurde mit dem Kit *DirectZol* der Firma ZymoResearch durchgeführt. Dazu wurden die Schweißdrüsen direkt nach der Isolation in Trizol lysiert und dann nach Anweisungen des Herstellers über die Säule aufgereinigt und mit nukleasefreiem Wasser eluiert.

Im Anschluss an die Isolation wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des Spektrometers *Nanodrop ND1000* bestimmt. Die Konzentration wird hierbei über die Absorption der Lösung bei 260nm (OD260) berechnet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.6. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde das *QuantiTect Reverse Transcription* Kit verwendet. Als Primer wurden die mitgelieferten unspezifischen Oligomere verwendet. Die erhaltene cDNA wurde auf 25 ng/ $\mu\text{L}$  für F11-Zellen und 12,5 ng/ $\mu\text{L}$  für hSGSCs mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.7. Primerdesign

Für die F11-Zellen wurden Primer benötigt, die spezifisch für Maus- und Rattenisofor-men der zu untersuchenden Genprodukte waren. Nur in wenigen Ausnahmen wurde diese Anforderung von den kommerziell erhältlichen Primerassays erfüllt. Für alle weiteren Gene wurden die Primerpaare selbst entwickelt. Dazu wurden zuerst die Sequenzabschnitte

bestimmt, die möglichst für alle bekannten mRNA-Isoformen von Ratte und Maus identisch waren. In diesen Sequenzabschnitten wurden dann mit dem Onlinetool *PrimerBlast* (National Centre for Biotechnology Information) nach passenden Primerpaaren gesucht. Die Primer sollten Schmelztemperaturen ( $T_M$ ) von  $60 \pm 1$  °C und eine  $T_M$ -Differenz innerhalb der Paare von maximal  $0,5$  °C aufweisen. Die vorgeschlagenen Primerpaare wurden mittels des Onlinetools *Oligo Analyzer* der Firma Integrated DNA Technologies auf mögliche Selbst- und Paarbindung sowie Sekundärstrukturen untersucht. Priorität wurde auf eine möglichst geringe 3'-Komplementarität der Oligomere gelegt, um eine unspezifische Primerverlängerung während der PCR-Reaktion zu vermeiden. Die ausgewählten Primersequenzen wurden von der Firma Biomers synthetisiert, als Stocklösung in einer Konzentration von  $50$   $\mu$ M in Wasser gelöst und bei  $-20$  °C gelagert. Detaillierte Informationen zu den verwendeten Primerpaaren sind in Tabelle A.2 einzusehen.

#### 3.2.8. Quantitative Real-Time-PCR

Für die PCR-Reaktion mit hSGSC-cDNA wurde die SYBRgreen-Mischung *SensiFAST* von Bioline verwendet. Die Reaktionen mit F11-cDNA wurden mit *SensiFAST* von Bioline oder *QuantiFAST* von Qiagen durchgeführt. Der SYBR-Mix wurde variiert, um die Effizienz zu optimieren und Nebenprodukte zu minimieren. Welcher SYBRgreen-Mix für welches F11-Primerpaar verwendet wurde, ist in Tabelle A.2 einsehbar. Die Ansätze wurden nach folgendem Pipettierschema erstellt:

cDNA	8 $\mu$ L
Primerpaar	2 $\mu$ L
SYBRgreen Mix	10 $\mu$ L

Jede PCR-Reaktion wurde in Triplikaten durchgeführt. Für jedes Gen wurde auf jeder Platte eine Negativkontrolle ohne cDNA gemacht. Für eine optimale Vergleichbarkeit der Expressionslevel pro Gen zwischen den Proben wurde die Plattenbelegung nach der Strategie der Probenmaximierung durchgeführt [Hellemans et al., 2007]. Das Protokoll der qPCR-Reaktion ist in Tabelle 3.8 dargestellt. Der PCR nachfolgend wurde für jede Probe eine Schmelzkurve mit einem Temperaturanstieg von  $0,5$  °C/min aufgenommen, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen.

Für die Bestimmung der  $C_q$ -Werte (*quantification cycle*) wurde der Fluoreszenzschwellenwert auf 300 AU (arbitrary units) festgelegt. Bei diesem Wert lagen alle Fluoreszenz-Kurven im Bereich des logarithmischen Wachstums. Die Effizienz der selbst designten Primerpaare wurde mit cDNA-Konzentrationsreihen bestimmt, was bei Beachtung be-

**Tabelle 3.8.:** Temperaturzyklen der PCR-Reaktion

Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
95	5 min	1
95	15 s	40
60	20 s	

stimmter Parametern ein zuverlässiger Ansatz ist [Svec et al., 2015]. Nur Primerpaare mit einer Effizienz zwischen 90 % und 115 % wurden für die Expressionsanalyse verwendet. Dabei wurde auch ein valider  $C_{q(\text{Ref})}$ -Bereich festgelegt, in dem die Effizienz stabil war. Für die kommerziell erworbenen Primerpaare für hSGSCs wurde eine Effizienz von 100 % angenommen. Für die Berechnung der relativen Genexpression wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta Cq = \frac{E_{(\text{Ref})}^{Cq(\text{Ref})}}{E_{(\text{GOI})}^{Cq(\text{GOI})}} \quad (3.1)$$

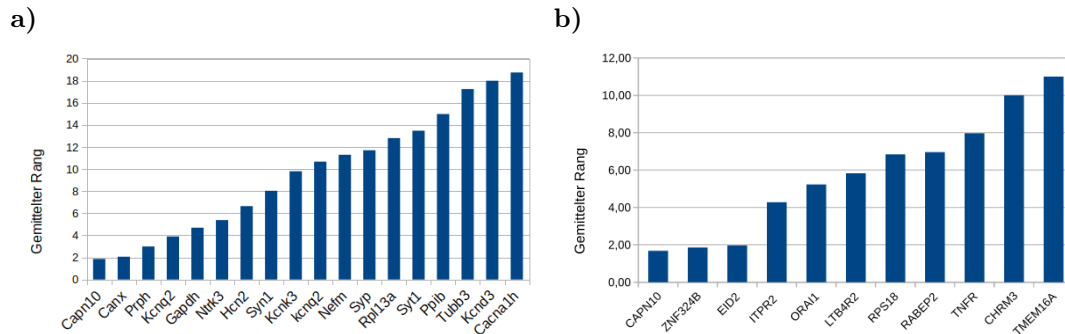
E = Effizienz +1, GOI: Gene of Interest, Ref: Referenzgen

Um für die Normierung ein stabiles Referenzgen festzulegen, wurden für beide Zelltypen separat Expressionsstabilitätsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Rohdaten der untersuchten Gene mit der Software *RefFinder* untersucht. Sie verbindet mehrere Algorithmen, nämlich geNorm, Normfinder, BestKeeper und die komparative  $\Delta C_q$ -Methode, und bietet damit eine solide Betrachtung der Expressionsstabilität [Xie et al., 2012].

In F11-Zellen wurden neben den Markergenen 5 potentielle Referenzgene untersucht (Canx, Capn10, Gapdh, Ppib, Rpl13a). Für die Untersuchung wurden 18 Proben verwendet, darunter mindestens 2 Proben jeder Kondition. Das stabilste Genprodukt war Capn10 (siehe Abbildung 3.2a). Capn10 wies jedoch in einigen nachfolgenden Proben  $C_q$ -Werte außerhalb des in der Effizienzanalyse festgelegten validen Bereiches auf und wurde daher nachträglich ausgeschlossen. Für die Berechnung von  $\Delta C_q$  wurde das Genprodukt mit der zweitstabilsten Expression verwendet, nämlich Canx. Die Expressionsergebnisse des Ionenkanals Scn8a wurden für den Expressionsvergleich nicht berücksichtigt, da die Rohdaten auf eine veränderte Amplifikationseffizienz des Primerpaares zwischen den Wiederholungen hindeuteten.

Um das Referenzgen für die Auswertung der hSGSCs festzulegen, wurde mit der Software RefFinder die Stabilität von 7 potentiellen Referenzgenen untersucht (CAPN10, EID2, LTB4R2, RABEP2, RPS18, TNFR, ZNF324B). In die Stabilitätsanalyse wurden 19 Proben einbezogen, enthalten waren Proben aus den hSGSC-Linien #1, #2 und #3

in den Konditionen 2D-DMEM, 2D-DMEM/F12<sup>+</sup> und 3D-DMEM/F12<sup>+</sup>. CAPN10 wies die größte Stabilität auf (siehe Abbildung 3.2b) und wurde als Referenzgen für die  $\Delta C_q$ -Berechnung verwendet.



**Abbildung 3.2.: Untersuchung der Expressionsstabilität.** Für die Auswahl eines geeigneten Referenzgens wurden für F11-Zellen (a) und hSGSCs (b) die zu untersuchenden Gene auf Expressionsstabilität untersucht. Dazu wurden die Rohdaten mit der RefFinder-Software analysiert. Dargestellt ist hier die zusammenfassende Wertung, welche alle drei implementierten Algorithmen berücksichtigt.

Für die statistische Analyse wurden die  $\Delta C_q$ -Werte mittels TwoWayANOVA auf Effekte der Kultivierungsart und des Mediums untersucht, alpha wurde dabei auf 0,05 festgelegt.

### 3.2.9. Kapillargelelektrophorese

Um die PCR-Produkte bezüglich der Länge zu validieren, wurde die DNA mittels Kapillargelelektrophorese analysiert. Dazu wurde das Gerät *QIAxcel* mit dem *DNA Screening Kit* der Firma Qiagen verwendet.

### 3.2.10. Patch-Clamping

Für die Patch-Clamp-Versuche wurde der *CytoPatch* mit der zugehörigen Software *CytoLogic* von der Firma Cytocentrics verwendet. Für die Untersuchung der Zellen aus der 2D-Kultur wurden die F11-Zellen mit Accutase abgelöst, die hSGSCs mit Trypsin. Die dissoziierten Zellen wurden in EC-Puffer resuspendiert.

Für die Messung entnimmt der Patch-Clamp-Automat die vorgelegte Zellsuspension über eine Kanüle mit 200  $\mu\text{m}$  Durchmesser und gibt diese auf einen mikrofluidischen Messchip. Auf dem Messchip befinden sich zwei nebeneinander angeordnete Patchkanäle. Innerhalb der Patchkanäle ist jeweils eine Patchpipette mit einem Durchmesser von

2,5  $\mu\text{m}$  eingelassen. Während des Fangens der Zellen ist ein Unterdruck an dem Patchkanal angelegt, um eine Zelle anzusaugen. Auf der Patchpipette ist ein leichter Überdruck angelegt, um eine Kontamination des Intrazellulärpuffers (IC) zu verhindern. Das Anlagern einer Zelle an den Patchkanal wird über eine Veränderung der elektrischen Parameter von der Software erkannt. Um eine dichte Verbindung zwischen Zellmembran und Patchpipette zu erreichen (englisch *seal*), wird nun ein Unterdruck an der Patchpipette angelegt. Um nachfolgend den Whole-Cell-Modus zu erreichen, wird an der Patchpipette eine Abfolge aus stärker werdenden Unterdruckimpulsen angelegt, um ein Loch in die Membran zu reißen. Ist dieser Schritt erfolgreich, kann eine Whole-Cell-Messung an der Zelle durchgeführt werden. Bedingung für eine Patch-Clamp-Messung ist das Erreichen eines möglichst hohen seal-Widerstands, als Schwellenwert wurde hier  $0,3\text{ G}\Omega$  festgelegt.

Der IC-Puffer für die Patch-Clamp-Messungen wurde steril filtriert, als entgaste Aliquots eingefroren und für jeden Messtag frisch aufgetaut. Der EC-Puffer wurde als Stocklösung steril filtriert und für jeden Messtag frisch verdünnt. Die Osmolarität des EC-Puffers wurde jedes Mal überprüft und wenn nötig durch Verdünnung mit destilliertem Wasser korrigiert, um eine Osmolaritätsdifferenz von 15 bis 20 mOsm zwischen EC und IC zu erreichen. Um eine Bindung der Zellen an die Oberfläche der Messchips zu verhindern, wurde diese mit 50 % FKS in EC abgesättigt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zellen aus der 2D-Kultur wurden enzymatisch dissoziiert, gezählt und in einer Konzentration von 1 bis  $2 \times 10^6$  Zellen/mL in Messpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in das aus Teflon bestehende Zellreservoir des CytoPatch gefüllt und automatisiert in regelmäßigen Intervallen mit einer 1000  $\mu\text{L}$  Spitze resuspendiert, um Aggregation zu verhindern. Bei Zellsuspensionsvolumina geringer als 500  $\mu\text{L}$  wurden die Zellen in einem konischen 1 mL Reaktionsgefäß vorgehalten und regelmäßig manuell resuspendiert. Sphäroide wurden nach der Ernte in Messpuffer resuspendiert und in ein konisches 1 mL Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig in regelmäßigen Abständen manuell resuspendiert. Das automatisierte Patchen von Einzelzellen wurde mit den voreingestellten Patchprotokollen durchgeführt. Für das automatisierte Patchen der Sphäroide wurden die Parameter des Catch and Seal- sowie des Whole Cell-Protokolls schrittweise modifiziert. Dabei wurde der Ansaugdruck von -8 mbar auf -16 mbar erhöht, der Sealing-Unterdruck zwischen -55 und -90 mbar variiert und der Unterdruckpuls für Erreichen des Whole Cell-Modus zwischen -80 mbar und -150 mbar variiert.

Für die Charakterisierung der Zellen wurden die in Tabelle 3.9 aufgelisteten Pulsprotokolle verwendet.

**Tabelle 3.9.: Patch-Clamping Pulsprotokolle**

NaV-Gradient	-90 mV (20 ms), -110 mV (20ms), -90 mV (100 ms), x mV (40 ms), -90 mV (20 ms); x = ansteigender Spannungspuls von -80 mV bis +60 mV in 5 mV Schritten
NaV-Standard	-90 mV (20 ms), -110 mV (20 ms), -90 mV (100 ms), -10 mV (40 ms), -90 mV (20 ms)
KV-Gradient	-80 mV (50 ms), -70 mV (50 ms), x mV (500 ms), -70 mV (50 ms); x = ansteigender Spannungspuls von -70 mV bis +70 mV in 10 mV Schritten
KV-Standard	-80 mV (50 ms), -70 mV (50 ms), +70 mV (500 ms), -70 mV (50 ms)

### 3.2.11. Calcium-Imaging

Beim Calcium-Imaging werden Farbstoffe eingesetzt, deren Absorptions- und/oder Emissionsspektrum abhängig von der umgebenden Calciumkonzentration sind. In dieser Arbeit wurden Fura-Red und Fluo-4 eingesetzt. Das Absorptionsspektrum von FuraRed verschiebt sich bei Calciumbindung in einen niedrigeren Wellenlängenbereich, das Emissionsspektrum verschiebt sich nur geringfügig. Fluo-4 hat nur bei Calciumbindung eine relevante Emission. Für die Immobilisierung von Sphäroiden für das Calcium-Imaging wurden mikroskopierbare Zellkulturschalen der Firma IBIDI (35 mm, Glasboden) mit 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  *CellTak*-Gewebekleber (Corning) nach Protokoll des Herstellers beschichtet. Zellaggregate wurden mit minimalem Mediumvolumen auf die beschichteten Schalen gegeben und nach 5 min mit Messpuffer überschichtet. Die Zellen der 2D-Kondition wurden direkt in IBIDI-Schalen mit Zellkulturbeschichtung kultiviert. Fura-Red und Fluo-4 wurden mit einer Konzentration von 1 mM in DMSO gelöst und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Zellen (2D und 3D) wurden mit Fura-Red (10  $\mu\text{M}$ ) und Fluo-4 (5  $\mu\text{M}$ ) zusammen mit Pluronic F-127 (0,04  $\mu\text{M}$ ) in Messpuffer für 1 h bei  $28^\circ\text{C}$  inkubiert. Um eine vollständige Deacetylierung der Farbstoffe zu erreichen, wurden die Zellen anschließend für 30 min mit Messpuffer bei  $28^\circ\text{C}$  inkubiert. Während der Deacetylierung wurde zusätzlich für 15 min mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst inkubiert, um die Zellzahl anhand der Zellkerne ermitteln zu können. Für die Messung wurden zu den Zellen 600  $\mu\text{L}$  Messpuffer vorgelegt. Die Zellen wurden während des Experimentes nacheinander im Abstand von 60 s mit Messpuffer (Negativkontrolle), Acetyl- $\beta$ -methylcholin (MCH) in verschiedenen Konzentrationen und Ionomycin als Positivkontrolle behandelt. MCH und Ionomycin wurden in Messpuffer gelöst. Für jede Messkondition (Kontrollen und Konzentrationserhöhungen)

wurden 50  $\mu\text{L}$  Volumen zu den Zellen hinzugegeben. Während des Experimentes wurde alle 5 s eine Aufnahme gemacht. Für die Detektion von Fluo-4 wurde mit 488 nm angeregt und im Bereich 500-530 nm detektiert. Die Detektion von Calcium-freiem Fura-Red wurde mit einer Anregung bei 561 nm und Detektion bei 600-670 nm durchgeführt. Pro Versuchswiederholung wurde ein Bildausschnitt analysiert, die Anzahl der gefärbten Zellen pro Ausschnitt lag zwischen 22 und 156. Die Anzahl Zellen pro Aufnahme war für 2D im Mittel deutlich höher als für 3D (110 Zellen vs. 63 Zellen). Aus den detektierten Emissionsintensitäten ( $I_{\text{Fluo4}}$ ,  $I_{\text{Fura Red free}}$ ) wurde für jede Zelle das Emissionsverhältnis  $R$  gebildet, welches bei Erhöhung der Calciumkonzentration ansteigt. Um die Intensität  $E$  der Zellantwort auf den Stimulus zu berechnen, wurde der Maximalwert des Verhältnisses der jeweiligen Kondition auf den Maximalwert der Negativkontrolle normiert. (Siehe Formel 3.2). Um die Zelle als stimulierbar zu kategorisieren, wurde ein Schwellenwert von  $E_S = 1,5$  festgelegt, der während der Stimulation durch MCH überschritten werden musste. Die Anzahl der stimulierbaren Zellen wurde durch die Anzahl aller sichtbaren Zellen geteilt, um für jede Kondition den Anteil der stimulierbaren Zellen zu berechnen. Für die konzentrationsabhängig angegebenen Werte der Intensität der Zellantwort und des Anteils der stimulierbaren Zellen wurden als jeweilige Untergrenze die Werte der vorherigen Stimulationsbedingungen verwendet.

$$R = \frac{I_{\text{Fluo4}}}{I_{\text{Fura Red free}}}, \quad E = \frac{R_{\text{Stim}}}{R_{\text{NK, max}}} \quad (3.2)$$

R: Emissionsverhältnis, I: Emissionsintensität, E: Intensität der Zellantwort, Stim: Stimulus, NK: Negativkontrolle

Die Methode des Calcium Imaging wurde nach [Klar et al., 2014] und [Buck, 2019] modifiziert.

#### 3.2.12. Statistik

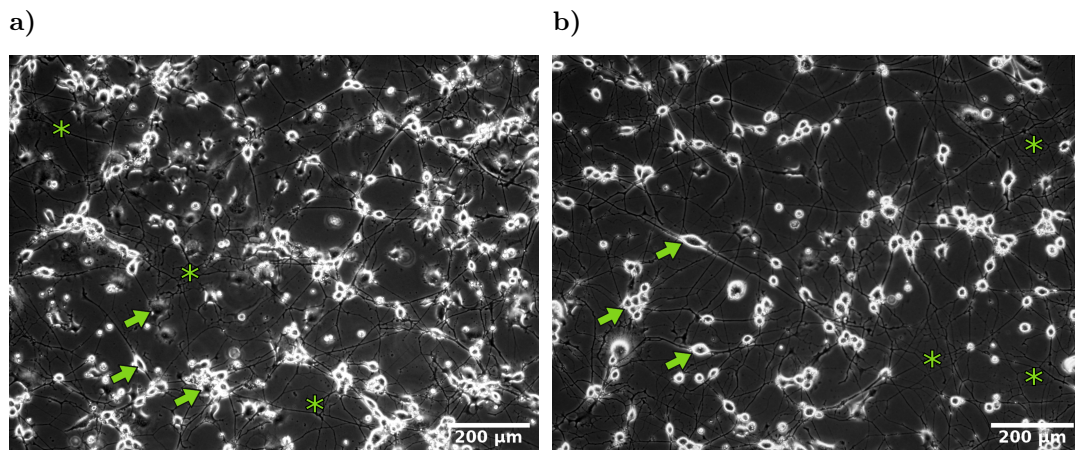
Die statistischen Tests (T-Test und *analysis of variance* (ANOVA)) wurden mit der Software Prism (GraphPad) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

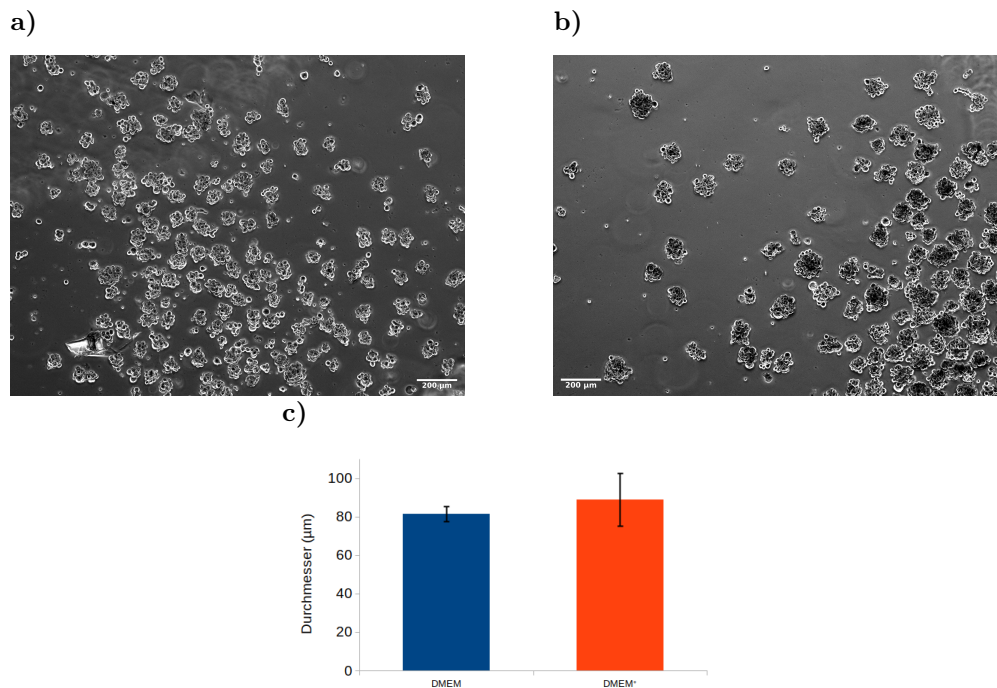
### 4.1. Neuronale Zellen

#### 4.1.1. 2D- und 3D-Kultivierung der F11-Zellen

Die F11-Zellen bildeten in der 2D-Kultur in beiden verwendeten Medien nach drei bis vier Tagen ein dichtes Netzwerk aus Neuriten, bezüglich der Zellmorphologie konnten dabei keine Unterschiede beobachtet werden (siehe Abbildung 4.1). Für die 3D-Kultur wurden die Zellen mit einer Dichte von 20 Zellen pro Kavität in Agarose-Mikromulden ausgesät. Der mittlere Durchmesser der Sphäroide betrug  $81,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$  (MW  $\pm$  SEM) in DMEM und  $88,9 \pm 8,0 \mu\text{m}$  in DMEM<sup>+</sup> (siehe Abbildung 4.2c), der Unterschied war dabei nicht signifikant ( $p = 0,421$ ).



**Abbildung 4.1.: F11-Zellen in 2D-Kultur.** Lichtmikroskopische Aufnahmen von F11-Zellen an Tag 3 in Kultur in DMEM (a) bzw. DMEM<sup>+</sup> (b). In beiden Medien bildeten sich dichte Netzwerke aus Neuriten (gekennzeichnet mit Sternchen), die von einzeln liegenden oder zusammengelagerten Somata ausgingen (gekennzeichnet mit Pfeilen).



**Abbildung 4.2.: F11-Zellen in 3D-Kultur.** Die F11-Sphäroide wurden mit einer initialen Zellzahl von durchschnittlich 20 Zellen pro Sphäroid in den Agarose-Mikromulden hergestellt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der F11-Sphäroide zeigten eine unregelmäßige Form mit deutlich voneinander abgegrenzten Einzelzellen in beiden Medien (a: DMEM, b: DMEM+). Der mittlere Durchmesser der Sphäroide wurde nicht vom Kulturmedium beeinflusst (c,  $n = 3$ , t-Test).

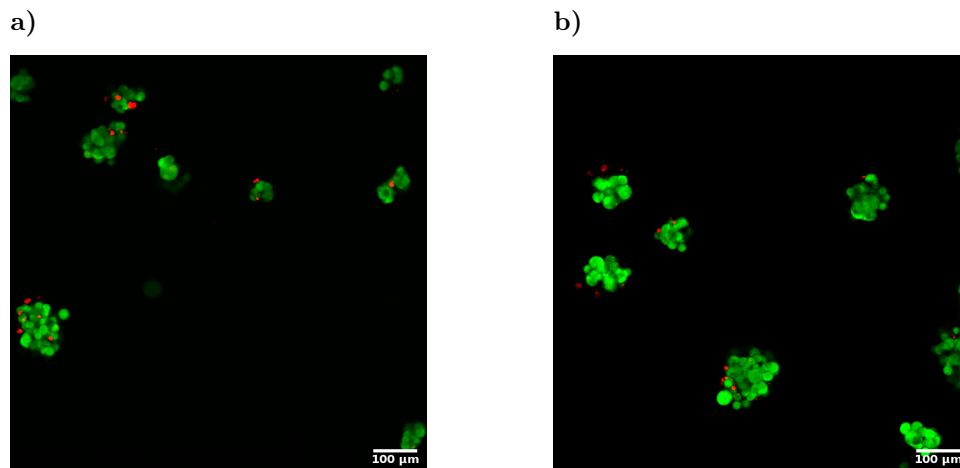
Eine Färbung der Sphäroide mit Fluorescein-Diacetat (FDA) und Propidium-Iodid (PI) zeigte einen großen Anteil lebender Zellen (siehe Abbildung 4.3). Die toten Zellen waren dabei homogen über das Sphäroidvolumen verteilt.

Sowohl in den Durchlichtaufnahmen der 3D-Kultur (Abbildungen 4.2a und 4.2b), als auch in den Fluoreszenzbildern der Vitalitätsfärbung (Abbildung 4.3), ist zu erkennen, dass die Zellen in den Sphäroiden in runder Morphologie vorlagen und traubenartig zusammengelagert waren.

#### 4.1.2. Expressionanalyse der F11-Zellen

Nach 8 Tagen in Kultur wurden die Zellen und Sphäroide geerntet, lysiert und einer quantitativen RNA-Expressionsanalyse unterzogen.

Unter den untersuchten Ionenkanälen befand sich kein Genprodukt, welches von der 3D Kultur oder dem Medium signifikant in seiner Expression beeinflusst wurde (siehe



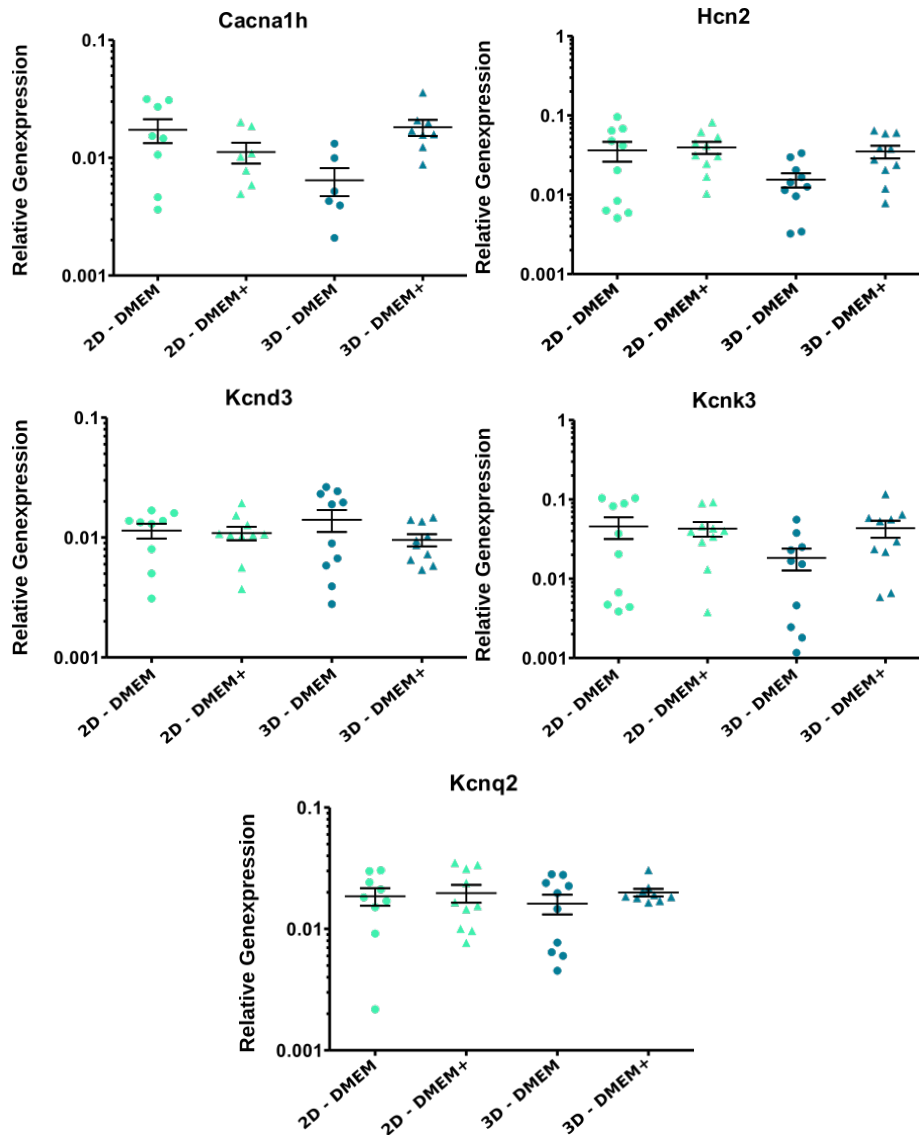
**Abbildung 4.3.: Vitalitätsfärbung von F11-Sphäroiden.** Die LSM-Fluoreszenzaufnahmen der FDA-PI-gefärbten Sphäroide aus DMEM (a) und DMEM<sup>+</sup> (b) zeigten eine gleichmäßige, nicht auf den Kern konzentrierte Verteilung der toten Zellen (rot) innerhalb der Sphäroide (lebende Zellen in grün).

Abbildung 4.4a).

In der Gruppe der strukturellen Marker wurde als einziges Genprodukt Neurofilament M (Nefm) durch die 3D-Kultur signifikant beeinflusst. Die Expression lag um den Faktor 2,12 höher als in 2D ( $p = 0,0138$ , siehe Abbildung 4.4b).

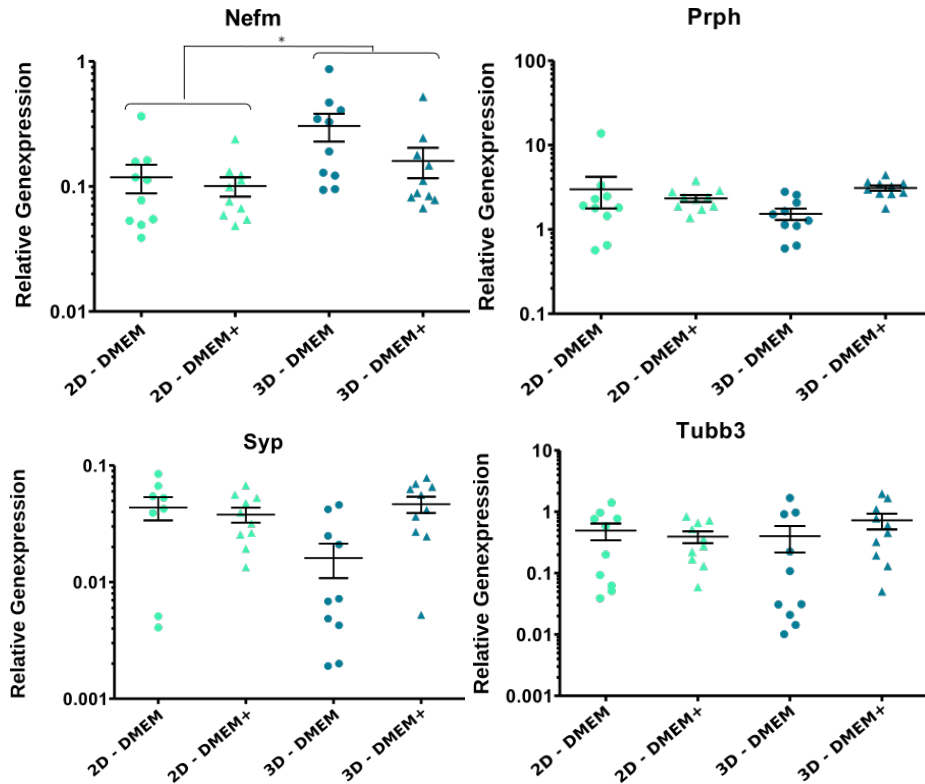
Bei den sonstigen Markern wurde nur Synaptotagmin (Syt)1 in seiner Expression durch die 3D-Kultur beeinflusst, die Expression war um den Faktor 2,11 geringer als in 2D ( $p = 0,0029$ ). Desweiteren wurde die Expression vom Neurotrophen Tyrosinkinase Rezeptor Typ 3 (Ntrk3) durch die Wahl des Mediums beeinflusst. Im Differenzierungsmedium (DMEM<sup>+</sup>) war die Expression um den Faktor 1,43 höher als ohne ( $p = 0,0012$ , siehe Abbildung 4.4c)

## a) Ionenkanäle



**Abbildung 4.4.: Expression peripherer neuronaler Marker in F11-Zellen.** Dargestellt sind die  $\Delta C_q$ -Werte gegen Canx normiert. Die Expression der untersuchten Ionenkanäle war unabhängig von Kulturbedingungen und Mediumzusätzen (a). In der Gruppe der strukturellen Marker war die Expression von Nefm in der 3D-Kultur gegenüber der 2D-Kultur erhöht (b). Bei den sonstigen Markern war die Expression von Ntrk3 im Differenzierungsmedium (DMEM<sup>+</sup>) höher als im Proliferationsmedium (DMEM). Syt1 wurde in 3D geringer exprimiert als in 2D (c). (n = 6-10, MW  $\pm$  SD, Two-Way-ANOVA; \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01).  
Abbildung wird fortgesetzt auf Seite 54.

## b) Strukturelle Marker



## c) Sonstige Marker

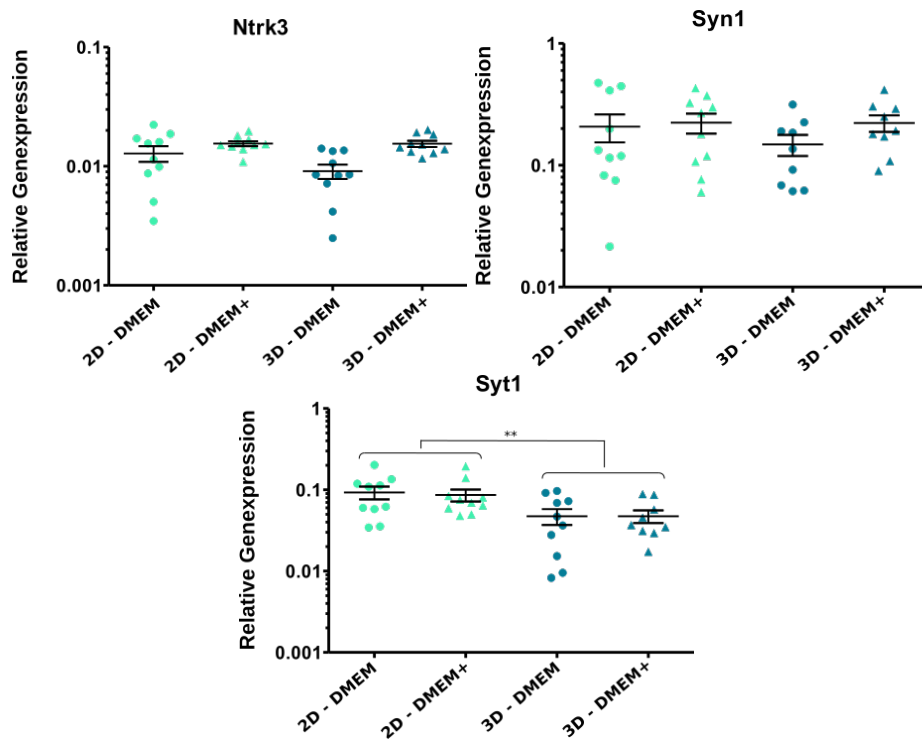


Abbildung 4.4.: Expression peripherer neuronaler Marker in F11-Zellen. Fortsetzung.

### 4.1.3. Patch-Clamping an F11-Zellen

Für eine Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen wurde automatisiertes Patch-Clamping mit dem *CytoPatch*-Gerät durchgeführt. Zunächst wurden vereinzelte Zellen der 2D-Kultur analysiert.

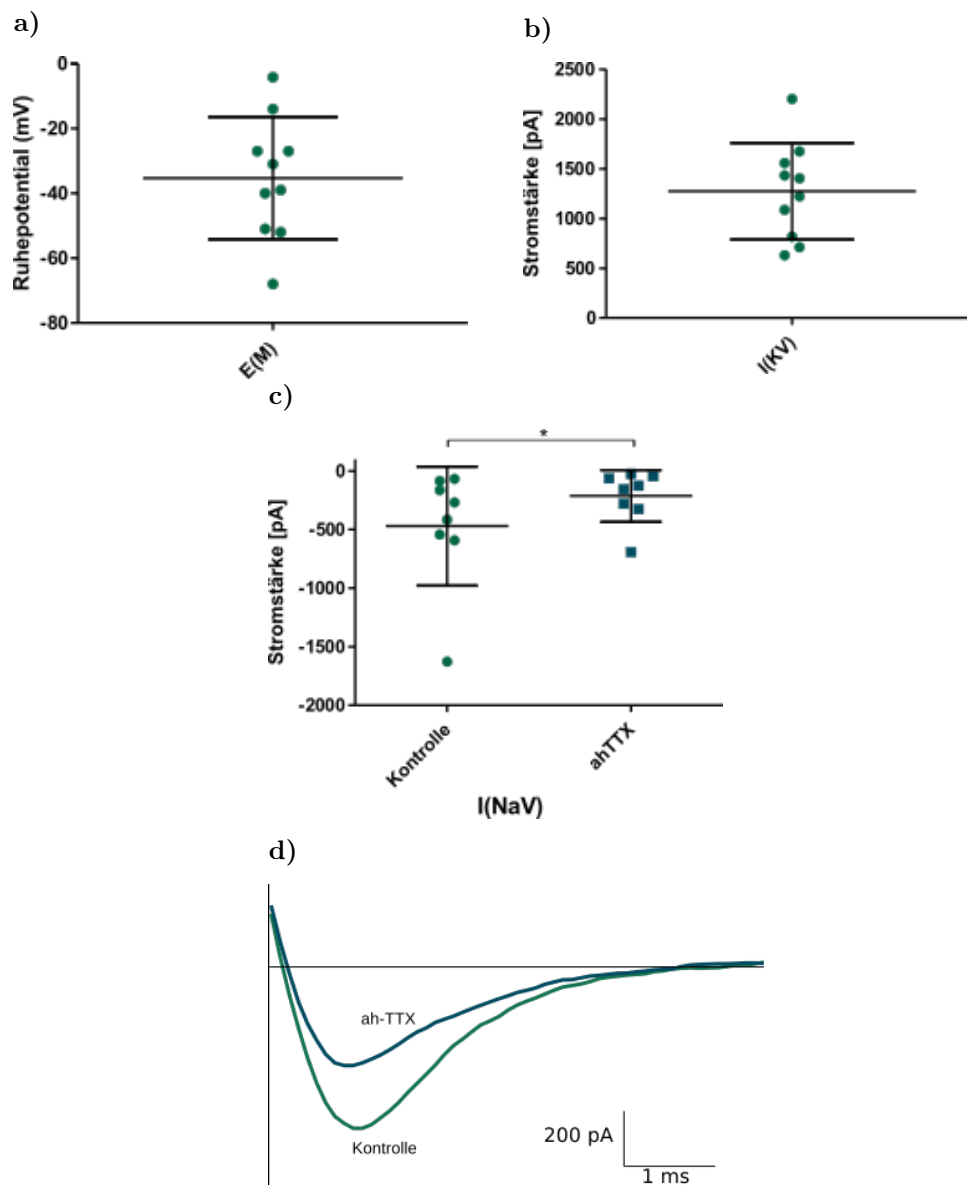
Alle Zellen wiesen sowohl einen negativen, als auch einen positiven spannungsabhängigen Strom auf. Mit dem Protokoll *Na<sub>V</sub>-Standard* wurde bei -10 mV ein minimaler negativer Strom von  $I_{\min} = -470,4 \pm 179,8$  pA (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ) gemessen. Unter dem Protokoll *K<sub>V</sub>-Standard* wurde bei +70 mV ein positiver Strom von  $I_{\text{plateau}} = 1273 \pm 153$  pA ( $n = 10$ ) beobachtet.

Die spezifische Inhibition eines DRG-relevanten spannungsgesteuerten Ionenkanals in F11-Zellen wurde am Beispiel von Na<sub>V</sub>1.6 untersucht. Als spezifischer Inhibitor wurde 4,-9-Anhydrotetrodotoxin (ahTTX) eingesetzt, welches eine hohe Selektivität für Na<sub>V</sub>1.6 gegenüber anderen Na<sub>V</sub>-Subtypen aufweist. Das Maß der Inhibition durch ahTTX sollte Aufschluss über den Anteil von Na<sub>V</sub>1.6 am gesamten Natriumstrom und eine eventuelle Veränderung durch die 3D-Kultur geben. Dazu wurde zuerst der Natriumstrom unter Kontrollbedingungen und anschließend unter Zugabe von 100 nM ahTTX gemessen.  $I_{\min}$  während des Na<sub>V</sub>-Standard-Assays wurde unter 100 nM ahTTX um  $55,2 \% \pm 8,7$  (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 8$ ,  $p = 0,0411$ ) verringert.

Im Folgenden sollte nun die Messung von Zellen aus der 3D-Kultur durchgeführt werden. Mit den in Suspension vorgelegten Sphäroiden konnte in einer aus 48 Messungen der Whole-Cell-Modus erreicht werden. In dieser Messung konnten, wie bei Zellen aus der 2D-Kultur, negative und positive spannungsabhängige Ströme gemessen werden. Die Sealqualität war aber unterhalb der kritischen Grenze von 0,3 G $\Omega$ , die Messung wurde daher nicht ausgewertet. In einer direkt anschließenden mikroskopischen Betrachtung des Messchips konnte die Messung eines Sphäroids zusätzlich nicht verifiziert werden, da sich das Aggregat bzw. die Zelle nicht mehr an der Patchpipette befand. Die Möglichkeit, dass bei der Messung eine von Sphäroiden abgelöste Einzelzelle gepatcht wurde, konnte dementsprechend nicht ausgeschlossen werden. Wiederholte mikroskopische Untersuchungen nach den Patchversuchen zeigten, dass Sphäroide auf den Messchips vorhanden waren.

Daraufhin wurden einige Parameter schrittweise verändert, um die Effizienz der Messung der Sphäroide zu steigern. Der Ansaugdruck wurde von -8 mbar auf -16 mbar erhöht, der Sealing-Unterdruck wurde zwischen -55 bis und -90 mbar variiert und der Unterdruckpuls für das Erreichen des Whole Cell-Modus wurde zwischen -80 mbar und -150 mbar variiert. Auch unter den veränderten Parametern konnte keine Whole-Cell-Konfiguration

erreicht werden ( $n = 16$ ).



**Abbildung 4.5.: Patch-Clamping an F11-Einzelzellen.** F11-Zellen aus der 2D-Kultur wurden enzymatisch dissoziiert und mit dem Patch-Clamp-Automaten im Whole-Cell-Modus gemessen. Das Membranpotential der Zellen wurde im Current-Clamp-Modus bei 0 pA bestimmt und wies eine große Streuung auf (a). Alle Zellen wiesen sowohl einen positiven ( $I(K_V)$ ), b) als auch einen negativen ( $I(Na_V)$ ), c) spannungsabhängigen Strom auf. Letzterer konnte durch 100 nM 4,9-Anhydrotetrodotoxin (ah-TTX) um 55,2 % inhibiert werden ( $n = 8$ , gepaarter T-Test; \*:  $p < 0,05$ ). In d) ist ein repräsentativer  $I(Na_V)$ -Verlauf einer Zelle mit und ohne ah-TTX gezeigt.

## 4.2. Schweißdrüsenzellen

### 4.2.1. Vergleich von Morphologie und Expressionsprofil der hSGSC-Linien

Für den Vergleich wurden drei hSGSC-Linien aus verschiedenen SpenderInnen kultiviert, im Folgenden hSGSC Linien #1, #2 und #3 genannt. Das Wachstumsbild der Zellen in der 2D-Kultur war im Proliferationsmedium (DMEM) langgestreckt und parallel strukturiert, im Differenzierungsmedium (DMEM/F12<sup>+</sup>) hingegen etwas weniger langgestreckt, sowie eher überlagernd und ungerichtet. Zwischen den Zelllinien waren morphologisch keine Unterschiede festzustellen. (Siehe Abbildung 4.6).

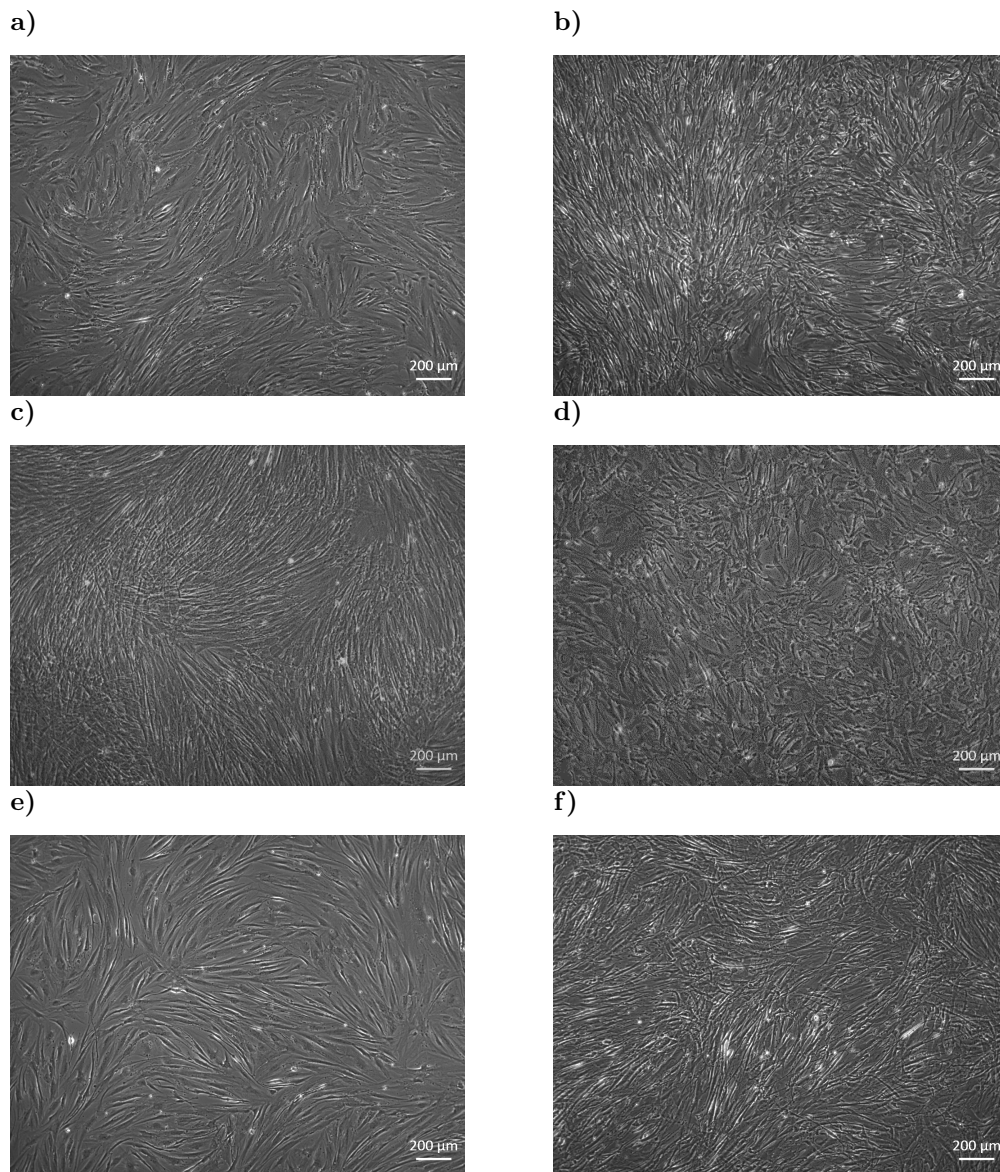
Die Untersuchung des Genexpressionsprofils mittels RT-qPCR (quantitative *real time*-PCR) zeigte dagegen Unterschiede zwischen den Zelllinien (siehe Abbildung 4.7).

Für CHRM3 konnte eine signifikante Expressionsdifferenz zwischen den Zelllinien festgestellt werden ( $p < 0,0001$ ). Dabei wurde die höchste Expression in hSGSC #2 beobachtet. Die Expressionswerte aus hSGSC #2 lagen um mindestens den Faktor 10 über den Werten aus hSGSC #1 und hSGSC #3. Dabei war die CHRM3-Expression in Differenzierungsmedium signifikant höher als in Proliferationsmedium ( $p = 0,0163$ ). Die hSGSC #2 im Differenzierungsmedium wiesen eine CHRM3-Expression auf, die um den Faktor 1,3 geringer war als die in ganzen Schweißdrüsen.

Die mRNA-Expression von ITPR2 war ebenfalls signifikant abhängig von der Zelllinie ( $p = 0,0186$ ). In hSGSC #2 lagen die Expressionswerte um den Faktor 1,3 niedriger als in hSGSC #1 und hSGSC #3. Die ITPR2-Expression in hSGSC-Zellen lag im Schnitt um den Faktor 3,6 (#1), 4,7 (#2) bzw. 3,7 (#3) niedriger als in ganzen Schweißdrüsen.

Die Expression der Gene ANO1 und ORAI1 unterschied sich nicht signifikant zwischen den Zelllinien. Die gemittelten Expressionslevel der drei hSGSC-Linien lagen um den Faktor 47 (ANO1) und 2 (ORAI1) niedriger als in den ganzen Schweißdrüsen.

Die beobachteten  $C_q$ -Werte (*quantification cycle*) der Gene AQP5 und CFTR lag in allen hSGSC-Gruppen außerhalb des quantitativ analysierbaren Rahmens, in ganzen Schweißdrüsen lag der  $\Delta C_q$ -Wert von AQP5 bei  $14,45 \pm 1,27$  und der von CFTR bei  $1,09 \pm 0,69$ .



**Abbildung 4.6.: Lichtmikroskopische Aufnahmen von hSGSCs in der 2D-Kultur.** Die drei untersuchten hSGSC-Linien (#1: a, b; #2: c, d; #3: e, f) waren sich in ihrer Morphologie sehr ähnlich. Im Standardmedium (DMEM) zeigten die Zellen eine langgestreckte, in Wirbeln angeordnete Form (a, c, e), im Differenzierungsmedium (DMEM/F12<sup>+</sup>) sahen die Zellen etwas weniger langgestreckt und chaotisch angeordnet aus (b, d, f).

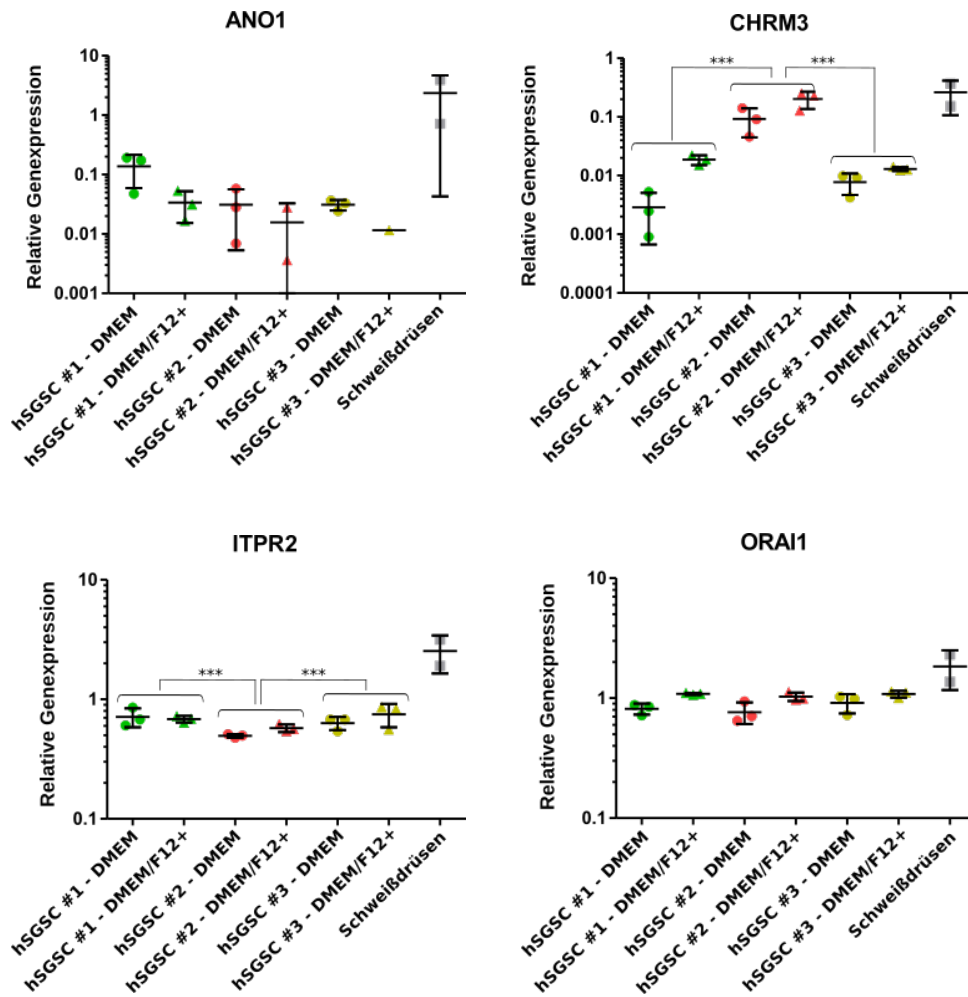
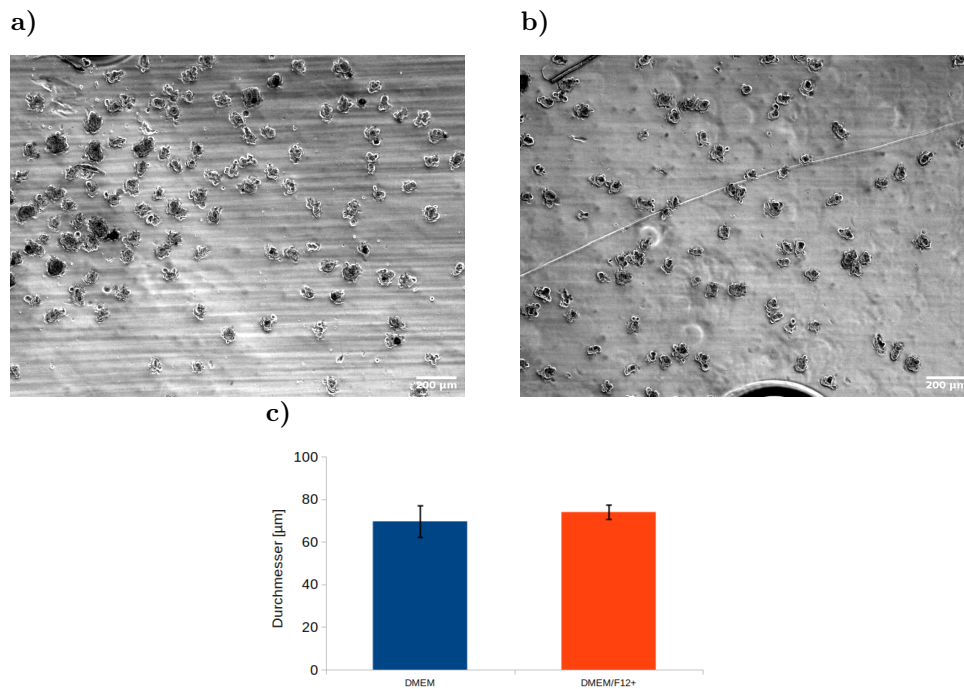


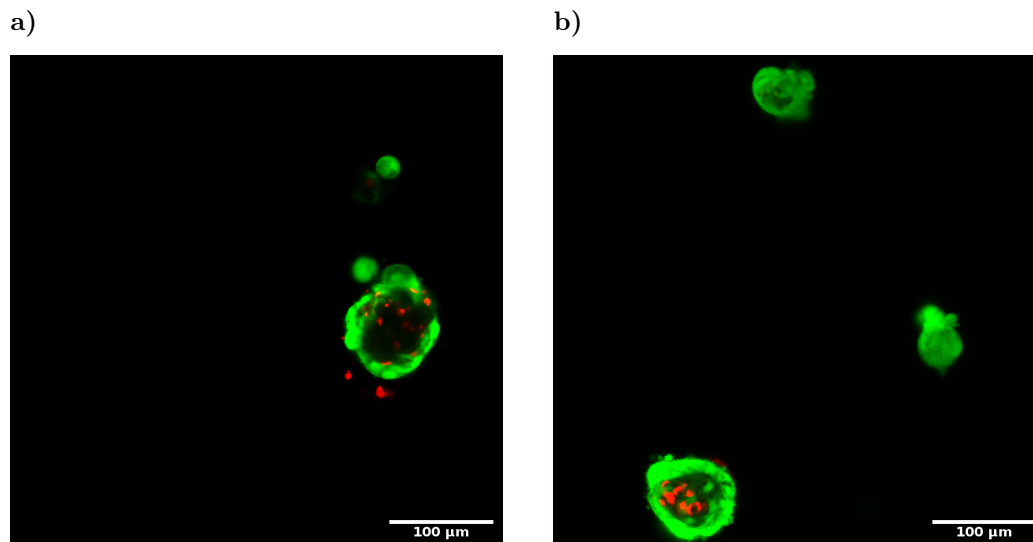
Abbildung 4.7.: Relative Genexpression der hSGSC-Linien. Die Expression der Schweißdrüsenmarker auf mRNA-Ebene ist relativ zum Referenzgen CAPN10 als  $\Delta C_q$ -Wert dargestellt. Die Expression von CHR3 und ITPR2 unterschied sich signifikant zwischen den Zelllinien. Die Expression von CHR3 wurde zusätzlich auch durch das Medium beeinflusst. (n = 3, TwoWay-ANOVA, \*\*\*: p < 0,001).

### 4.2.2. 3D-Kultivierung der hSGSCs

Für die Untersuchung des Effektes der 3D-Kultur auf hSGSCs wurde aufgrund der höchsten CHRM3-Expression die hSGSC-Linie #2 verwendet. Die Zellen wurden für die 3D-Kultur in Agarose-Mikromulden ausgebracht. Die Zellen aggregierten innerhalb von 24 Stunden und formten kompakte Sphäroide, welche nach sieben Tagen einen Durchmesser von  $69,7 \pm 4,3 \mu\text{m}$  (MW  $\pm$  SEM) in Proliferationsmedium und  $74,0 \pm 1,9 \mu\text{m}$  in Differenzierungsmedium aufwiesen. Es konnte kein signifikanter Effekt der unterschiedlichen Medien auf den durchschnittlichen Durchmesser gezeigt werden ( $p = 0,3727$ , siehe Abbildung 4.8). Zur Überprüfung der Vitalität der aggregierten Zellen wurde eine Färbung mit Fluorescein-Diacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. In der Peripherie der Sphäroide waren überwiegend FDA-positive und PI-negative Zellen vorhanden. Der Kern der Sphäroide zeigte, besonders bei größeren Exemplaren, viele PI-positive Zellen (siehe Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.8.: Morphologie der hSGSC 3D-Kultur.** Die hSGSC-Sphäroide wurden mit einer initialen Zellzahl von durchschnittlich 30 Zellen pro Sphäroid in den Agarose-Mikromulden hergestellt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Sphäroide zeigten keinen Unterschied zwischen der Kultur mit Proliferationsmedium (DMEM, a) und Differenzierungsmedium (DMEM/F12<sup>+</sup> b). der Sphäroiddurchmesser wurde nicht durch die Wahl des Mediums beeinflusst ( $n = 3$ , t-Test) (c).



**Abbildung 4.9.: Vitalitätsfärbung der hSGSC-Sphäroide.** LSM-Aufnahmen der FDA-PI-gefärbten Sphäroide aus Proliferationsmedium (a) und Differenzierungsmedium (b) zeigten, dass die toten PI-positiven Zellen (rot) vor allem auf das Innere der Sphäroide konzentriert waren und von einer kompakten, vitalen FDA-positiven Zellschicht umgeben waren (grün).

#### 4.2.3. Expressionsanalyse der hSGSC-3D-Kultur

Die 3D-Kultur hatte einen signifikanten Effekt auf die Expression von ANO1, CHRM3 und ORAI1 (siehe Abbildung 4.10). Die Expression von ANO1 lag in der 3D-Kultur um den Faktor 13,2 höher als in 2D ( $p = 0,0246$ ) und um den Faktor 7,6 niedriger als in ganzen Schweißdrüsen.

CHRM3 wurde in der 3D-Kultur um den Faktor 3,3 geringer exprimiert als in 2D ( $p = 0,0026$ ). Der Expressionsunterschied zwischen hSGSC-3D und den ganzen Schweißdrüsen entsprach einem Faktor von 5,8. Die erhöhte CHRM3-Expression in Differenzierungsmedium gegenüber Proliferationsmedium konnte erneut beobachtet werden ( $p = 0,0302$ ).

ORAI1 wurde in der 3D-Kultur um den Faktor 2,0 geringer exprimiert als in 2D ( $p = 0,0021$ ) und um den Faktor 4,1 geringer als in ganzen Schweißdrüsen. Auf die Expression von ITPR2 hatte die 3D-Kultivierung keinen signifikanten Effekt. Die Expression in hSGSCs lag um den Faktor 4,3 niedriger als in ganzen Schweißdrüsen.

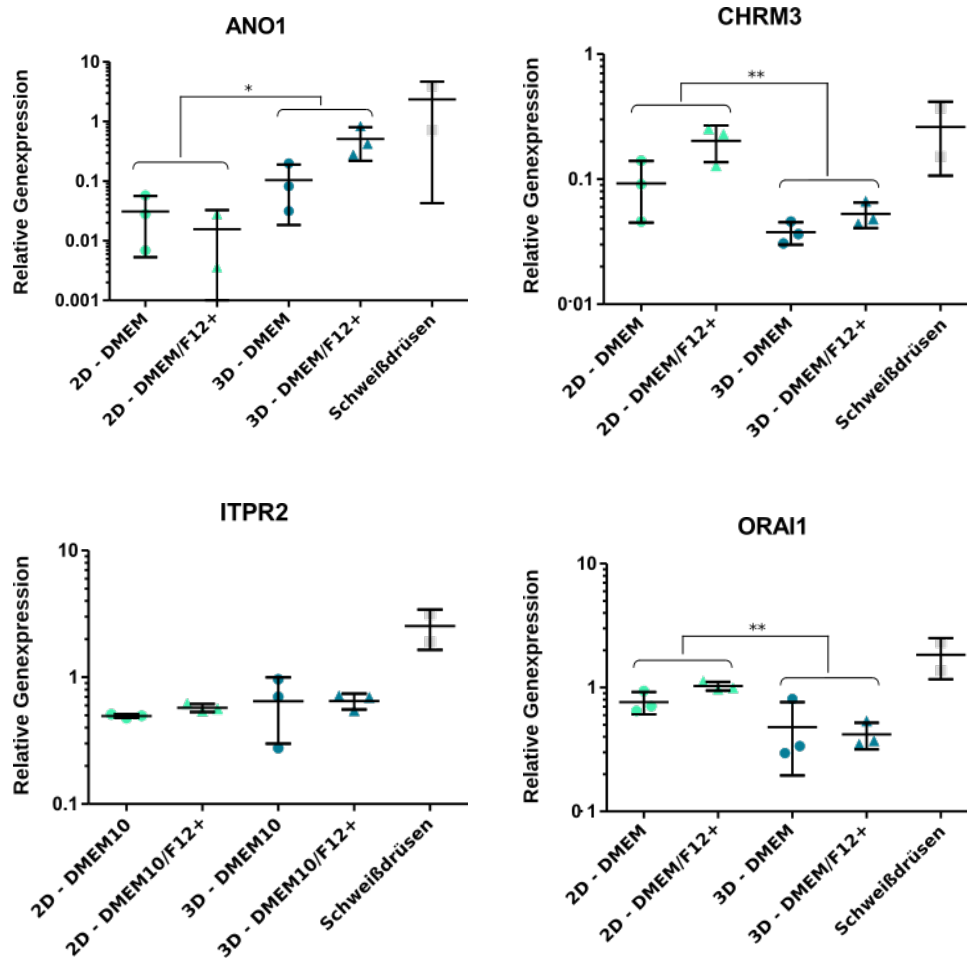
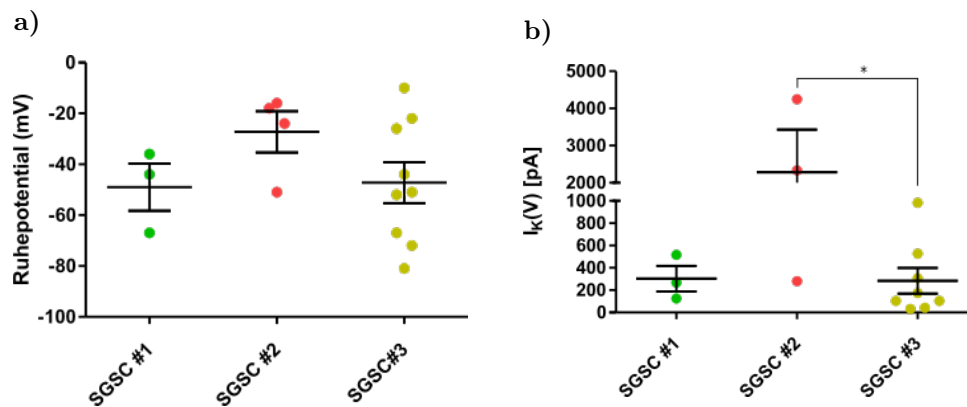


Abbildung 4.10.: Vergleich der relativen Genexpression zwischen 2D- und 3D-Kultur in hSGSCs. Die Expression der Schweißdrüsenmarker auf mRNA-Ebene in hSGSC #2 wurde gegen das Referenzgen CAPN10 normiert und ist als  $\Delta C_q$ -Werte dargestellt. Signifikante Effekte zwischen 2D und 3D konnten für ANO1, CHR3 und ORAI1 ermittelt werden. Die Expression von CHR3 war zusätzlich von der Wahl des Mediums abhängig. (n = 3, TwoWay-ANOVA, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ )

#### 4.2.4. Patch-Clamping an hSGSCs

Für eine Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen wurde automatisiertes Patch-Clamping mit dem *CytoPatch*-Gerät durchgeführt. Zellen aller drei verwendeten hSGSC-Linien konnten in den Whole-Cell-Modus gebracht werden. Die Messeffizienz (erfolgreiche Messungen/versuchte Messungen) der hSGSCs unterschied sich dabei deutlich zwischen den Zelllinien. Als erfolgreiche Messung wurden die Zellen gezählt, bei denen nach Einleitung des Whole-Cell-Modus einen Widerstand von mindestens  $0,3\text{ G}\Omega$  vorlag. hSGSC #2 wies mit 5 % (3/65) die geringste Messeffizienz auf. hSGSC #1 und #3 konnten mit einer Effizienz von 19 % (3/16) bzw. 29 % (8/28) gemessen werden. Das mittlere Ruhepotential der hSGSCs lag bei  $-49,0\text{ mV} \pm 16,09\text{ mV}$  (#1),  $-27,3 \pm 16,2\text{ mV}$  (#2) und  $-47,2 \pm 24,2\text{ mV}$  (#3) (siehe Abbildung 4.11a). Die Unterschiede waren nicht signifikant ( $p = 0,228$ ). Für hSGSC #1 und #3 konnte bei Durchführung des  $\text{Na}_V$ -Aktivierungsprotokolls kein spannungsabhängiger negativer Strom beobachtet werden. Für hSGSC #2 wurde in 1 von 3 Zellen ein spannungsabhängiger negativer Strom gemessen, der bei 35 mV einen minimalen Wert  $I_{\text{min}}$  von  $-228\text{ pA}$  aufwies. Alle gemessenen Zellen wiesen im  $K_V$ -Activation-Protokoll einen spannungsabhängigen positiven Strom auf. Der gemessene Strom  $I(K_V)_{\text{Plateau}}$  bei 70 mV betrug für hSGSC #1  $303,3 \pm 198,4\text{ pA}$  (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ), für hSGSC #2  $2285 \pm 1982\text{ pA}$  ( $n = 3$ ) und für hSGSC #3  $284 \pm 326,6\text{ pA}$  ( $n = 8$ ) (siehe Abbildung 4.11b). Ein OneWay-ANOVA-Test ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien ( $p = 0,0177$ ).



**Abbildung 4.11.: Patch-Clamping an hSGSC-Zellen der 2D-Kultur.** Das Membranpotential der hSGSCs wurde im Current-Clamp-Modus bei 0 pA bestimmt, es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien (a). Der spannungsabhängige Plateaustrom im  $K_V$ -Activation-Protokoll war in hSGSC #2 signifikant höher als in hSGSC #1 und hSGSC #3 (b).  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  SD, OneWay-ANOVA, \*:  $p < 0,05$

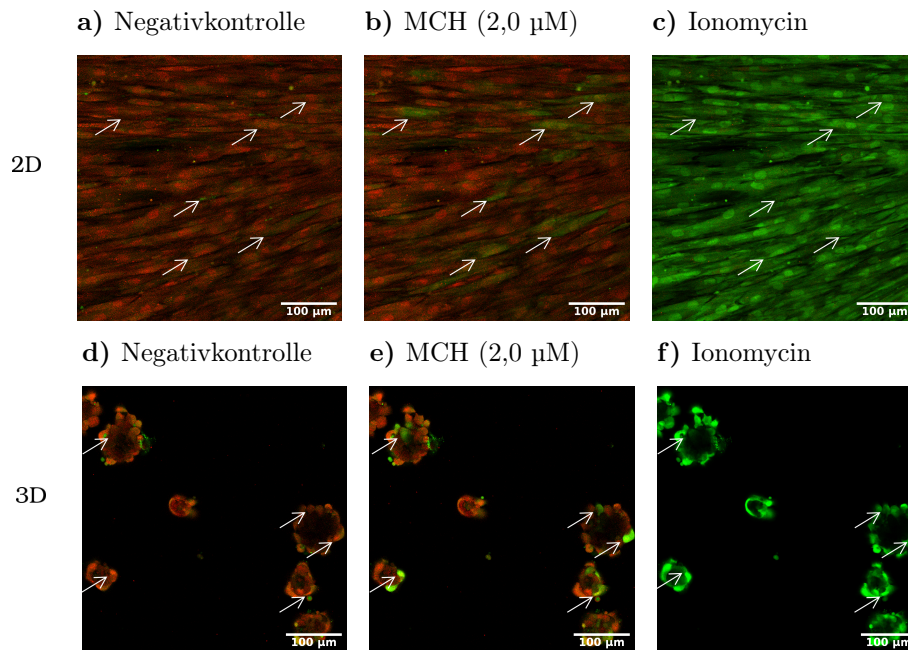
Um die Reaktion der Zellen auf  $\beta$ -methyl-Acetylcholin (MCH) zu untersuchen, wurde die Membranspannung konstant bei -70 mV (Voltage-Clamp) gehalten und 5  $\mu$ M MCH appliziert. hSGSC #1 ( $n = 1$ ) und #3 ( $n = 5$ ) zeigten keine Antwort auf MCH (Daten nicht dargestellt). In einer hSGSC #2-Zelle konnte eine Veränderung des Membranstroms beobachtet werden (siehe Abbildung A.1). Da nur in einer einzigen hSGSC #2-Zelle stabile Messkondition über eine ausreichende Dauer erreicht werden konnten, wurde keine Auswertung durchgeführt.

Für die Untersuchung der 3D-Kultur wurden die Sphäroide wie beschrieben gerntet, in EC resuspendiert und in ein konisches 1 mL Reaktionsgefäß transferiert, um dem Patch-Clamping-Automat zugeführt zu werden. Weder mit den Standardeinstellungen ( $n = 18$ ), noch mit veränderten Druck-Parametern ( $n = 24$ ), konnte eine stabile Messkonfiguration mit einem hSGSC-Aggregat erreicht werden.

#### 4.2.5. Calcium-Imaging an hSGSCs

Um den Effekt der 3D-Kultur auf funktioneller Ebene zu untersuchen, wurde Calcium-Imaging durchgeführt. Die Zellen wurden mit den Calcium-sensitiven Farbstoffen Fura-Red und Fluo-4 gefärbt. Die Zellen wurden dann mit Acetylcholin in verschiedenen Konzentrationen sowie Ionomycin als Positivkontrolle behandelt, zu Beginn wurde eine Negativkontrolle mit Messpuffer durchgeführt. In Abbildung 4.12 sind beispielhaft Aufnahmen des Calcium-Imagings gezeigt.

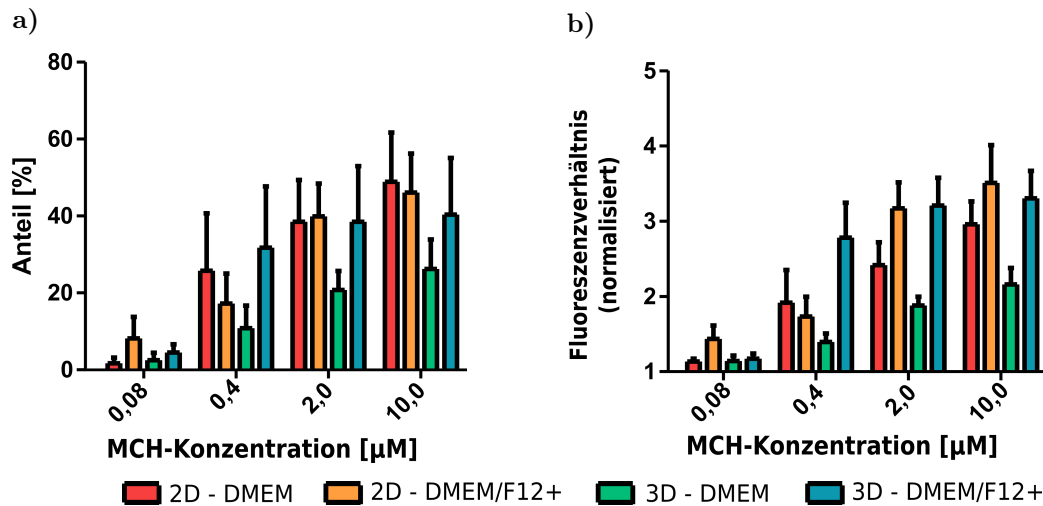
In Abbildung 4.13a ist der Anteil der MCH-stimulierbaren Zellen über alle eingesetzten



**Abbildung 4.12.: Beispielhafte Aufnahmen des Calcium-Imagings in hSGSCs.** hSGSCs #2 aus der 2D- (a-c) und 3D- (d-f) Kultur wurden mit FuraRed und Fluo-4 gefärbt und dann mit MCH als kumulative Konzentrationsreihe stimuliert. Die Abbildungen sind übereinanderlagerungen zweier Fluoreszenzkanäle und zeigen repräsentativ hSGSCs aus der 2D-Kultur in DMEM und der 3D-Kultur in DMEM/F12<sup>+</sup> in den Stimulationsbedingungen Negativkontrolle (a, d), 2,0 µM MCH (b, e) und Ionomycin als Positivkontrolle (c, f). Die Pfeile markieren beispielhaft Zellen, die auf die MCH-Stimulation mit einer erhöhten Konzentration des cytoplasmatischen Calciums reagierten.

MCH-Konzentrationen aufgetragen. Der Anteil der durch MCH-Zugabe stimulierbaren Zellen war bei 10 µM MCH in 3D im Mittel um den Faktor 1,5 kleiner als in 2D, der Unterschied war nicht signifikant ( $p = 0,1758$ ). Zellen in DMEM/F12<sup>+</sup> wiesen bei 10 µM MCH einen um den Faktor 1,2 höheren Anteil an stimulierbaren Zellen auf, der Unterschied war ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,4719$ ).

Um die relative Stärke des Calciumeinstroms zu untersuchen, wurden der Maximalwert des Emissionsverhältnisses Fluo-4/Fura-Red jeder stimulierbaren Zelle auf die Kontrollbedingung normiert. Für jede Kultivierungskondition wurde der Mittelwert über alle stimulierbaren Zellen gebildet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Die Intensität der Antwort war bei 10 µM in DMEM/F12<sup>+</sup> um den Faktor 1,3 höher als in DMEM ( $p = 0,0372$ ). Für die 2D-Kultur war der Wert im Mittel um 1,2 höher als in 3D, die Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,192$ ).



**Abbildung 4.13.: Veränderung der Calcium-Konzentration durch MCH-Stimulation in hSGSCs.** Das Maß der Zellantwort von hSGSC #2 auf die Stimulation durch MCH wurde als Verhältnis der Emissionsintensitäten von Fluo-4 und Fura Red berechnet. (a) Zellen, die während der MCH-Stimulation eine Erhöhung des Quotienten um mindestens den Faktor 1,5 aufwiesen, wurden als stimulierbar definiert. Der Anteil der stimulierbaren Zellen an der Gesamtzellzahl ist in (a) dargestellt. Der Anteil wurde weder durch die Kultivierungsart noch durch Medium signifikant beeinflusst ( $n = 3 - 4$ , TwoWay-ANOVA). Als Maß für die Quantität des Calciumeinstromes pro Zelle für jede Kondition ist in (b) der mittlere maximale Fluoreszenzquotient im Verhältnis zur Kontrollkondition dargestellt. Die statistische Auswertung der Fluoreszenzquotienten ergab eine signifikante Abhängigkeit vom Kulturmedium. Die Kultivierungsart beeinflusste das Fluoreszenzverhältnis nicht signifikant. ( $n = 3 - 4$ , TwoWay-ANOVA)

## 5. Diskussion

### 5.1. Betrachtung des mRNA-Expressionsprofils in hSGSCs in Bezug auf die sekretorische Funktion

Um die hSGSCs bezüglich ihres schweißsekretorischen Potentials einzuordnen, wird im Folgenden für die wichtigsten der untersuchten Genprodukte ein Vergleich zu nativen Schweißdrüsen und diversen Schweißdrüsenmodellen gezogen.

Die Expression von Aquaporin 5 (AQP5) auf transkriptioneller Ebene lag in allen untersuchten hSGSC-Linien und in allen Konditionen unterhalb der Nachweisgrenze. In humanen Schweißdrüsen wird AQP5 im coil exprimiert [Klaka et al., 2017, Hubka et al., 2015], und zwar hauptsächlich von *dark cells* [Kabashima et al., 2008]. In Mäusen zeigte ein knock-out von AQP5 keinen Effekt auf Dichte und Morphologie der Schweißdrüsen [Nejsum et al., 2002, Song et al., 2002]. Nejsum *et al.* beobachteten eine verringerte Anzahl an aktiven Schweißdrüsen, Song *et al.* konnten dagegen keinen Unterschied in der Schweißproduktion zwischen AQP5-defizienten und Wildtyp-Mäusen feststellen.

In 3D-Schweißdrüsenmodellen aus primären Schweißdrüsenzellen [Klaka et al., 2017, Li et al., 2015], sowie aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) [Wang et al., 2020] konnte eine AQP5-Expression gezeigt werden. Klaka *et al.* konnten zudem zeigen, dass primäre Schweißdrüsenzellen in 2D Kultur die Expression von AQP5 verlieren [Klaka et al., 2017]. In NCL-SG3-Zellen wurde die Expression von AQPs bisher nicht untersucht.

Möglicherweise ist AQP5 wichtig für die Entwicklung von Schweißdrüsen. Der Einfluss auf die Schweißsekretion ist strittig, es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Ionenströme und Signalwege in Schweißdrüsen nicht direkt von AQP5 beeinflusst werden.

Das Expressionslevel des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) war in allen untersuchten hSGSC-Linien unterhalb der Nachweisgrenze. In Schweißdrüsen ist dieser Ionenkanal unabdingbar für die Schweißsekretion über den beta-adrenergen Weg [Sato and Sato, 1984, Sato et al., 1989].

Eine CFTR-Expression in hSGSCs unterhalb der Nachweisgrenze weist darauf hin, dass in diesen Zellen keine Schweißsekretion über cAMP-erhöhende Signale wie die ad-

renerge Stimulation möglich ist. In anderen Schweißdrüsenzellen oder -modellen wurde die Expression von CFTR mit einer Ausnahme nicht untersucht. Einzig für die NCL-SG3-Zelllinie wurde die Funktionalität des cAMP-abhängigen Sekretionsweges analysiert [Servetnyk and Roomans, 2007, Wilson et al., 1994, Lee and Dessi, 1989, Mork et al., 1996]. Die Arbeiten zeigen jedoch konträre Ergebnisse und lassen keine eindeutige Schlussfolgerung zum Vorhandensein von CFTR-Kanälen zu.

In den hSGSCs konnte für den muskarinergen Acetylcholinrezeptor 3 (CHRM3) eine Expression auf mRNA-Ebene, sowie die Funktionalität über Calcium Imaging gezeigt werden. In im Differenzierungsmedium kultivierten hSGSC#2 lag die CHRM3-Expression nahe am Level der ganzen Schweißdrüsen. Thermoregulatorisches Schwitzen im Menschen hat physiologisch die größte Bedeutung gegenüber anderen Arten der Schweißsekretion. Es wird primär über cholinerge Stimulation geregelt (siehe Abschnitt 2.3.1). Die Expression von CHRM3 ist für sekretorische Schweißdrüsenmodelle daher ein wichtiges Gütekriterium. Die viel genutzte Zelllinie NCL-SG3 ist nicht über den cholinergen Weg stimulierbar [Lee and Dessi, 1989], was auf ein Fehlen des CHRM3 hinweist. Für einige andere Schweißdrüsenmodellsysteme konnte die Funktionalität des CHRM3-Signalweges nachgewiesen werden [Klaka et al., 2017, Liang et al., 2016, Yao et al., 2019]. Damit besitzen die hSGSCs in dieser Hinsicht kein Alleinstellungsmerkmal, erfüllen aber eine wichtige Voraussetzung für eine sekretorische Aktivität und die Nutzung als sekretorisches Schweißdrüsenmodell.

Die Expression von Anoctamin 1 (ANO1, auch TMEM16A) konnte in den untersuchten hSGSCs auf mRNA-Ebene gezeigt werden. ANO1 spielt als Calcium-aktivierter Chlorid-Kanal (CaCC) eine entscheidende Rolle bei der Produktion des Primärschweißes. In der Zelllinie NCL-SG3 konnte eine funktionelle Expression von ANO1 gezeigt werden [Ertongur-Fauth et al., 2014, Concepcion et al., 2016].

Die Expression von ANO1 in den hSGSCs ist ein notwendiger Marker für die sekretorische Differenzierung und eine wichtige Voraussetzung für eine Nutzbarkeit als Schweißdrüsenmodell.

Die Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen hSGSC-Linien, die für CHRM3 und Inositoltriphosphatrezeptor 2 (ITRPR2) beobachtet wurden, können verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist, dass sie spenderbedingt sind. Sato *et al.* beschreiben eine interindividuelle Variabilität in der Aktivität von Schweißdrüsen [Sato and Sato, 1983b]. Genetische und epigenetische Unterschiede in regulatorischen oder den untersuchten Genen selber könnten dabei für die Unterschiede in der Expressionsstärke verantwortlich sein. Eine andere Möglichkeit liegt in der den hSGSC-Linien zu Grunde

liegenden Erstellung der Explantkultur. Für die Herstellung der Zelllinien wurden mehrere ganze Schweißdrüsen in eine Kulturschale gebracht, die daraus auswachsenden Zellen bildeten den Grundstock einer hSGSC-Linie. Dabei ist unklar, ob und wie viele apokrine Schweißdrüsen in der Explantkultur der einzelnen Zelllinien vorhanden waren und ob es Unterschiede zwischen hSGSCs aus den verschiedenen Schweißdrüsentypen gibt.

## 5.2. Identifizierung von geeigneten Referenzgenen für die qPCR-Analyse

In dieser Arbeit konnten für beide Zelltypen Gene gefunden werden, die eine größere Expressionsstabilität aufwiesen, als die zu untersuchenden Gene (GOIs). Das Abschneiden in der Stabilitätsreihenfolge war sowohl bei den klassisch genutzten Haushaltsgenen, als auch bei den moderneren Referenzgenen sehr gemischt. Das teilweise schlechte Abschneiden der Haushaltsgene entspricht den Ergebnissen diverser Arbeitsgruppen [Thellin et al., 1999, Lee et al., 2002, Eisenberg and Levanon, 2013]. Für ein Set aus Genen, für die eine ubiquitär stabile Expression in humanen pluripotenten Stammzellen propagiert wurde [Holmgren et al., 2015], konnte teilweise eine stabile Expression in beiden Zelltypen gezeigt werden. Dazu gehörte Calpain 10 (Capn10), das interessanterweise sowohl in hSGSCs als auch in F11-Zellen die stabilste Expression aller untersuchten Gene aufwies. Insgesamt konnte in dieser Arbeit die Wichtigkeit der sorgfältigen Auswahl der Referenzgene für die RT-qPCR bestätigt werden.

## 5.3. Effekte der Differenzierungsmedien auf die mRNA-Expression

### 5.3.1. Erhöhte Expression von Ntrk3 in F11-Zellen durch Differenzierungsmedium

Das Differenzierungsmedium (DMEM<sup>+</sup>) führte in F11-Zellen bei dem Neurotrophen Tyrosinkinase Rezeptor Typ 3 (Ntrk3, auch TrkC genannt) zu einer erhöhten Expression. Ntrk3 wird in propriozeptiven sensorischen Neuronen exprimiert [Moqrich et al., 2004] und spielt eine große Rolle bei der Entwicklung, Axonwachstum und Regeneration [Lykissas et al., 2007, Menard et al., 2018].

HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) sorgt für eine Wachstumsunterdrückung von nicht fusionierten Neuroblastoma-Zellen aufgrund deren Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Defizit und wurde für die Herstellung der F11- Zell-

linie, als auch in einigen Arbeiten für die weitere Kultivierung verwendet [Boland and Dingle, 1990a, Vetter and Lewis, 2010]

Der *second messenger* cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) bzw. dessen Derivate haben diverse Effekte auf zelluläre Funktionen, unter anderem auf die Differenzierung [Rall and Sutherland, 1961, Roisen et al., 1972, Cai et al., 2001, Yamamizu and Yamashita, 2011]. Die differenzierungsfördernde Wirkung von cAMP und cAMP-erhöhenden Substanzen wie Forskolin konnte auch für F11-Zellen in Form von verstärktem Neuritenauswuchs gezeigt werden [Ghil et al., 2000].

Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von cAMP führt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). PKA-Aktivierung führt zur Phosphorylierung von bestimmten Proteinen, darunter auch Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB (*cAMP responsive element (CRE) binding protein*) [Montminy et al., 1990]. Die Ntrk3-Expression in F11-Zellen könnte somit durch von dem cAMP-PKA-Signalweg regulierte Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden. Für einige neurale Wachstumsfaktoren und -rezeptoren konnte in Schwanzzellen eine cAMP-abhängige Regulierung gezeigt werden [Yamamoto et al., 1993]. Dieser Mechanismus ist auch für Ntrk3 in Neuronen denkbar. Allerdings sind in der Literatur keine Hinweise auf eine direkte Beeinflussung der Ntrk3-Expression durch den cAMP-PKA-Signalweg zu finden. Eine indirekte Beeinflussung der Ntrk3-Expression erscheint ebenfalls möglich. Ogihara *et al.* beschreiben eine Abhängigkeit der Ntrk3-Expression von *Runx3* in murinen DRG-Neuronen [Ogihara et al., 2016]. Für F11-Zellen konnte eine Expression von Runx3 gezeigt werden [Yin et al., 2016]. In der Runx3-Promoterregion konnte sowohl bei Menschen auch als bei Zebrafischen ein CRE nachgewiesen werden [Lim et al., 2011, Simões et al., 2014]. Vermutlich ist auch in der murinen Runx3-Promoterregion ein CRE-Element vorhanden. Möglicherweise führte also die erhöhte cAMP-Konzentration CREB-vermittelt zu einer erhöhten Runx3-Expression, die wiederum einen Anstieg der Ntrk3-Expression auslöste.

### 5.3.2. Anstieg von CHRM3-Expression in hSGSCs durch Differenzierungsmedium

In hSGSCs wurde unter Verwendung des Differenzierungsmediums eine deutlich erhöhte Expression von CHRM3 gegenüber dem Standardmedium festgestellt. Für CHRM3 wurde in trachealen glatten Muskelzellen des Hundes eine erhöhte Promoteraktivität bei Serumdeprivation beobachtet [Forsythe et al., 2002]. Auch konnte ein steigender Einfluss von EGF auf die mRNA-Expression der Schweißdrüsenmarker Keratin 8 (K8) und carcino-embryonalem Antigen (CEA) gezeigt werden, ohne dass dabei CHRM3 unter-

sucht wurde [Liang et al., 2016]. Für EGF wurde außerdem eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Reifung der Schweißdrüse *in vivo* beschrieben [Li et al., 2002], CHR3 könnte davon betroffen sein. Es spricht also einiges dafür, dass der hier beobachtete Effekt des Differenzierungsmediums durch EGF ausgelöst wurde.

## 5.4. Effekte der 3D-Kultur auf die mRNA-Expression

### 5.4.1. 3D-Kultur hat keinen Einfluss auf Ionenkanalexpression in F11-Zellen

Um potentielle Effekte der 3D-Kultur auf die neuronale Differenzierung zu untersuchen, wurde für F11-Zellen eine 3D-Sphäroidkultur etabliert. Die ungleichmäßige Form der Sphäroide sowie das homogene Verteilungsmuster der toten Zellen bei insgesamt guter Vitalität deutete auf eine lockere Sphäroidstruktur hin, die auch als *traubenartig* bezeichnet wird [Edmondson et al., 2014].

Das in der 3D-Kultur verstärkt exprimierte Nefm ist Teil des Cytoskelettes, dessen Expression und Anordnung unter anderem durch mechanische Reize und Protein-Signalkaskaden reguliert wird. Vermutlich spielen bei dem Einfluss der 3D-Kultur auf die Genexpression besonders Cadherine und Integrine eine Rolle, welche die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion der Zellen steuern und als Rezeptoren für diese Interaktionen dienen. Nach aktuellem Kenntnisstand wurde der Einfluss von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion auf die Expression von Nefm bisher nicht untersucht. Nefm gilt als quantitativer Differenzierungsmarker für neuronale Zellen [Jones-Villeneuve et al., 1982, Schmidt et al., 1992, Paterno et al., 1997]. Die erhöhte Expression könnte demzufolge auf eine erhöhte Differenzierung der F11-Zellen in Sphäroiden hinweisen. Da jedoch kein anderer, insbesondere kein funktioneller, Marker erhöht exprimiert war, kann hier insgesamt eher nicht von einer differenzierungsfördernden Wirkung der Sphäroidkultur auf F11-Zellen gesprochen werden.

Syt1, welches in der 3D-Kultur eine verminderte Expression zeigte, ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor [Park and Ryu, 2018] und wichtig für das Neuritenwachstum neuronaler Zellen [Kabayama et al., 1999, Fukuda and Mikoshiba, 2000]. Ob die verringerte Expression von Syt1 in der Sphäroidkultur mit einem verringerten Neuritenwachstum einher geht, lässt sich durch die komplexe Zellanordnung schwer überprüfen. Ein Vergleich zur 2D-Kultur wäre durch die großen Unterschiede in der Zellumgebung auch nur bedingt sinnvoll.

Eine differenzierende Wirkung der Sphäroidkultur auf periphere oder andere neuronale Zellen wurde in anderen Arbeiten bisher selten untersucht. In einer der wenigen Publi-

kationen diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass eine vorhergehende 3D-unterstützte neuronale Differenzierung von humanen induzierten Pluripotenten Stammzellen (iPS) ein leicht verstärktes Neuritenwachstum in einer nachfolgenden 2D-Kultur zur Folge hat. Eine erhöhte Expression der neuronalen Marker  $\beta$ -3-Tubulin (Tubb3) oder Mitogen-aktivierte Proteinkinase 2 (Mapk2) durch vorhergehende 3D-Kultur konnte ebenfalls in einigen der untersuchten iPS-Linien beobachtet werden. [Chandrasekaran et al., 2017]

#### 5.4.2. hSGSCs bilden kompakte Sphäroide mit veränderter Genexpression

Um zu prüfen, ob die 3D-Kultivierung die Differenzierung von hSGSCs zu sekretorischen Schweißdrüsenzellen verstärkt, wurde auch für diesen Zelltyp eine Sphäroidkultur etabliert.

Die in dieser Arbeit gezeigte kompakte Morphologie der hSGSC-Sphäroide mit toten Zellen im Lumen und vitalen, flachen und eng gepackten Zellen in den äußeren Schichten entspricht größtenteils den Ergebnissen einer anderen Arbeit, in der ebenfalls Sphäroide aus Schweißdrüsenzellen untersucht wurden [Klaka, 2017]. Das Absterben von Zellen im Kern von kompakten Sphäroiden konnte auch in Experimenten mit anderen Zelltypen gezeigt werden [Curcio et al., 2007, Anada et al., 2012]. Grund für einen nicht-vitalen Kern in multizellulären Sphäroiden ist oft eine unzureichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, die zu Nekrose führt [Hirschhaeuser et al., 2010].

Das veränderte Expressionsmuster der 3D- gegenüber der 2D-Kultur zeigt einen deutlichen Effekt der Sphäroidkultivierung auf die hSGSCs. Dieser Effekt konnte auch von Klaka *et al.* in Experimenten mit primären Schweißdrüsenzellen aus Explant-Kulturen gezeigt werden [Klaka, 2017, Klaka et al., 2017]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verringerte Expression von CHRM3, erhöhte Expression von ANO1 und nicht nachweisbare Expression von AQP5 in der 3D-Kultur unterscheiden sich dabei von den Ergebnissen von Klaka *et al.*, die für CHRM3 und AQP5 eine signifikante Expressionserhöhung und für ANO1 ebenfalls eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Expressionserhöhung zeigten. Die von Klaka *et al.* verwendete Explant-Kultur mit anschließender Subkultivierung der Zellen entsprach dabei weitestgehend der Gewinnung der hSGSCs, wobei Schweißdrüsengang und -knäuel separat in Kultur genommen wurden. Der Stammzellcharakter dieser Zellen wurde nicht untersucht. Klaka *et al.* konnten in ihren Versuchen eine große Spendervariabilität bei den Effekten der 3D-Kultur auf die Expression der untersuchten Markergene zeigen, die eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Arbeiten sein könnte.

## 5.5. Elektrophysiologische Eigenschaften der hSGSCs und F11-Zellen und Limitierung des automatisierten Patch-Clamping für multizelluläre Sphäroide

### 5.5.1. Starke Verringerung des NaV-Stroms durch Inhibition von NaV1.6 in F11-Zellen

Für die funktionelle Untersuchung wurde zunächst automatisiertes Patch-Clamping an Einzelzellen durchgeführt. Die Parameter des gemessenen positiven Stroms in F11-Einzelzellen sind typisch für spannungsgesteuerte Kaliumkanäle ( $K_V$ ) vom Typ *delayed rectifier* [Manis, 2015].

Die Parameter des beobachteten negativen Stroms sind typisch für schnell aktivierende spannungsgesteuerte Natrium-Kanäle ( $Na_V$ ) [Zhang et al., 2017]. Die in dieser Arbeit beobachteten spannungsgesteuerten positiven und negativen Ströme der F11-Zellen sind konsistent mit den Ergebnissen von Pastori *et al.*, die eine ausführliche elektrophysiologische Charakterisierung von 2D-kultivierten F11-Zellen durchgeführt haben [Pastori et al., 2019].

Die hier gemessene Inhibition des Stroms der schnell aktivierenden Ionenkanäle im  $Na_V$ -Protokoll um 55 % zeigt, dass der spannungsgesteuerte Natriumkanal  $Na_V1.6$  einen hohen Anteil am gesamten  $Na_V$ -Strom in F11-Zellen hat. Die gewählte Konzentration von 4,9-Anhydrotetrodotoxin (ah-TTX) inhibiert  $Na_V1.6$  fast vollständig, während andere  $Na_V$ -Subtypen davon kaum beeinflusst werden [Rosker et al., 2007]. Dabei ist zu beachten, dass der schnell aktivierte spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Strom protokollbedingt mit abgebildet wurde. Der Anteil von  $Na_V1.6$  am gesamten spannungsgesteuerten Natriumstrom könnte demnach höher sein als 55 %. In anderen Arbeiten wurde bisher weder auf Protein-, noch auf funktioneller Ebene der Anteil von  $Na_V1.6$  am gesamten  $Na_V$ -Strom in DRG-Primärzellen oder -Zelllinien untersucht. Der in dieser Arbeit beobachtete große Anteil von  $Na_V1.6$  zeigt ein Potential der F11-Zellen für die Entwicklung von  $Na_V1.6$ -inhibierenden Schmerzmedikamenten.

### 5.5.2. Patch-Clamping an hSGSCs

Auch für hSGSCs wurde zur funktionellen Untersuchung zunächst Patch-Clamping an Einzelzellen durchgeführt. Die Zellen aller drei untersuchten hSGSC-Linien konnten im Whole-Cell-Modus mit unterschiedlichem Erfolg gepatcht und vermessen werden. Die Patch-Erfolgsrate war insgesamt niedrig. Das mittlere Ruhepotential von hSGSC#1 und #3 lag bei -49 mV bzw. -47 mV, das von hSGSC#2 bei -27 mV. Die gemessenen Un-

terschiede im mittleren Ruhepotential der hSGSC-Linien wiesen zwar keine Signifikanz auf, könnten aber dennoch ein Hinweis auf unterschiedliche Zelltypen sein. In der Arbeit von Reddy *et al.* wurden die elektrophysiologischen Parameter der verschiedenen Zelltypen der humanen Schweißdrüse bestimmt. Dabei lag das Ruhepotential von Myoepithelzellen bei -69 mV, das von  $\beta$ -adreno-sensitiven Zellen bei -57 mV und das von  $\beta$ -adreno-insensitiven bei -22 mV. [Reddy and Quinton, 1992] Die  $\beta$ -adreno-sensitiven Zellen beschreiben dabei wahrscheinlich *clear cells*, da diese aufgrund ihrer Funktion am  $\beta$ -adrenergen Signalweg der Schweißsekretion beteiligt sein müssen. Der  $\beta$ -adreno-insensitive Zelltyp müsste demnach die *dark cells* beschreiben. Nach aktuellem Stand wurde die Expression der  $\beta$ -Adrenorezeptoren bisher noch nicht zelltypspezifisch untersucht. Möglicherweise entsprechen die SGSC-Linien #1 und #3 eher dem *clear cell*-Phänotyp und Linie #2 eher dem *dark cell*-Phänotyp.

Generell ist die Messung des Ruhepotentials in kleinen Zellen nur bedingt aussagekräftig durch physikalische Limitationen der Methode [Wilson *et al.*, 2011]. Diese Aussage wird unterstützt durch Ergebnisse von Jones *et al.*, die eine hohe Variabilität des Ruhepotentials innerhalb der Schweißdrüsenzelltypen zeigen und Unterschiede zu den oben erwähnten Ergebnissen von Reddy *et al.* aufweisen [Jones and Kealey, 1987].

Der in allen hSGSC-Zellen beobachtete positive Stromfluss im  $K_V$ -Assay spricht für funktionelle Expression von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen. Diese Beobachtung passt zu den Arbeiten von Louie *et al.* und Fujii *et al.*, die einen Einfluss von spannungsgesteuerten  $K_V$ -Kanälen, genauer  $K_V1.2$  oder  $3$ , auf die Schweißsekretion in Menschen gezeigt haben [Fujii *et al.*, 2016, Louie *et al.*, 2017]. Mit einer einzigen Ausnahme wiesen alle gemessenen Zellen keinen positiven Stromfluss im  $Na_V$ -Aktivierungsprotokoll auf. Dies weist darauf hin, dass spannungsgesteuerte Natrium- oder Calciumkanäle in den hSGSCs nicht oder nur auf sehr niedrigem Level exprimiert sind. Die Tatsache, dass in einer einzigen Messung ein positiver Strom beobachtet werden konnte, spricht für eine heterogene Expression der zu Grunde liegenden Ionenkanäle in den hSGSCs. Bei dem gemessenen positiven Strom wurde nicht genauer differenziert, ob es sich um einen Natrium- oder Calciumstrom handelte. In der Literatur sind keine Hinweise auf eine Expression von  $Na_V$ -Kanälen in Schweißdrüsen zu finden. Die Expression von  $Ca_V$ -Kanälen, genauer dem  $Ca_V1$  (L-Typ), konnte hingegen indirekt in Schwitzversuchen an menschlicher Haut gezeigt werden [Metzler-Wilson *et al.*, 2014].

Weiterhin konnte bei einer hSGSC #2-Zelle eine Reaktion auf die MCH-Stimulation beobachtet werden. Diese Beobachtung weist auf eine funktionelle Expression des CHRM3 in hSGSC #2 hin.

### 5.5.3. Automatisiertes Patch-Clamping nicht auf Sphäroide anwendbar

Um die 2D- mit der 3D-Kultur zu vergleichen, wurden Patch-Clamping Versuche mit den Sphäroiden beider Zelltypen durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Sphäroide beider Zelltypen den Perfusionsvorgang überstehen und den Messchip erreichen. Die Größe und Festigkeit der Sphäroide waren somit angemessen für den Perfusionsschritt. Eine stabile Messkonfiguration einer Zelle konnte jedoch weder für die F11-, noch für hSGSC-Sphäroide erreicht werden. Bisher wurden nach aktuellem Kenntnisstand auch keine anderen Arbeiten veröffentlicht, die erfolgreich automatisiertes Patch-Clamping an multizellulären Sphäroiden oder anderen 3D-Strukturen durchgeführt haben. Die Methode des automatisierten Patchclampings ohne Gerätemodifikation scheint somit nicht für die Analyse von multizellulären Sphäroiden geeignet zu sein.

## 5.6. Differenzierungsmedium erhöht maximalen Calciumeinstrom in hSGSC bei MCH-Stimulation

Weiterführend wurde für die hSGSCs Calcium-Imaging durchgeführt, um Effekte von 3D-Kultur und Differenzierungsmedium auf den CHRM3-abhängigen Calciumsignalweg der Zellen zu untersuchen. Die Anzahl der  $\beta$ -methyl-Acetylcholin (MCH)-reaktiven Zellen und die Intensität des Calciumeinstromes zeigten dabei ähnliche Ergebnisse, was die Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Kultur so wie zwischen Proliferations- und Differenzierungsmedium angeht.

Die stärkere Reaktion der MCH-reaktiven Zellen aus dem Differenzierungsmedium gegenüber denen aus dem Proliferationsmedium kann mit der erhöhten CHRM3-Expression auf mRNA-Ebene erklärt werden, die in der RT-qPCR beobachtet wurden.

Die tendenziell geringere cholinerge Stimulierbarkeit der hSGSCs in der 3D- gegenüber der 2D-Kultur, die allerdings keine Signifikanz aufwies, könnte analog durch die gezeigte verringerten Genexpression von CHRM3 und ORA11 bedingt sein.

Ein direkter Einfluss der Expression von CHRM3 oder ORA11 auf den cholinerg induzierten Calciumeinstrom wurde bisher noch in keiner anderen Arbeit untersucht.

Die Ergebnisse des Calcium-Imaging weisen darauf hin, dass die hSGSC-Line eine Mischpopulation ist, deren Subpopulationen sich durch die Reaktivität auf MCH unterscheiden. Es könnte sich dabei um Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus oder um unterschiedliche Zelltypen handeln.

Es ist anzumerken, dass der Schwellenwert für die Bewertung als MCH-reaktive Zelle mit 1,5 recht hoch gesetzt wurde. Beispielsweise wurde von Desai *et al.* bei Experimenten

mit SH-SY5Y-Zellen ein Schwellenwert von 1,15 verwendet [Desai et al., 2006]. Der in dieser Arbeit verwendete Wert wurde anhand der Schwankungen während der Kontrollbedingung festgelegt und sollte falsch-positive Wertungen verhindern. Die hohe Spezifität geht jedoch zu Lasten der Sensitivität und schließt schwach reaktive Zellen von der Auswertung aus.

## 5.7. Fazit und Ausblick

Für die F11-Zellen konnte weder unter Differenzierungsmedium noch in der 3D-Kultur eine verstärkte Differenzierung gezeigt werden. Eine wichtige Beobachtung war dabei, dass die F11-Sphäroide eine vergleichsweise lockere Struktur aufwiesen. In zukünftigen Experimenten könnte versucht werden, die Kompaktheit der Sphäroide beispielsweise durch bestimmte Wachstumsfaktoren zu erhöhen, um einen stärkeren Effekt der 3D-Kultur zu erreichen. Weiterhin könnte der  $\text{Na}_V1.6$ -Anteil am gesamten  $\text{Na}_V$ -Strom in primären DRG-Zellen untersucht werden, um die Relevanz der F11-Zellen für die Schmerzforschung und Entwicklung von  $\text{Na}_V1.6$ -spezifischen Medikamenten einzuordnen.

Für die hSGSCs konnte erstmals die Expression von funktionellen Schweißdrüsenmarkern und die generelle Eignung als sekretorisches Schweißdrüsenmodell gezeigt werden. Die hSGSCs bildeten kompakte, runde Sphäroide, deren Größe über die eingesetzte Zellzahl reguliert werden konnte. Sowohl das Differenzierungsmedium als auch die 3D-Kultur hatten einen deutlichen Effekt auf die mRNA-Expression von wichtigen Markerproteinen. Dabei erhöhte das Differenzierungsmedium die Expression des Acetylcholin-Rezeptors CHRM3 und stellt somit eine hilfreiche Methode für die Differenzierung von hSGSCs zu einem sekretorischen Phänotyp dar. Der Effekt der 3D-Kultur auf die mRNA-Expression war kontrovers und kann nicht als eindeutig differenzierungsfördernd eingestuft werden. Um den Mechanismus der durch die 3D-Kultur hervorgerufenen Effekte zu ergründen, könnte die Expression bzw. Aktivität von an der Zell-Zell-Interaktion beteiligten Faktoren wie Cadherine, Catenine und Rho-GTPasen untersucht werden, sowie von an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligten Faktoren wie Integrinen.

In dieser Arbeit wurde in hSGSCs die Existenz eines spannungsabhängigen Kaliumstroms gezeigt. Um zu prüfen, ob dieser Strom durch  $\text{K}_V1$ , 2 oder 3 vermittelt wird, könnten im Patchclamping spezifische Inhibitoren eingesetzt werden, sowie eine Expressionsanalyse der  $\text{K}_V$ -Subtypen durchgeführt werden.

Für beide Zelltypen konnte gezeigt werden, dass die physiko-mechanischen Voraussetzungen des Patch-Clamping-Gerätes nicht für die Analyse von mehrzelligen Sphäroiden geeignet sind. Um die Zellen der 3D-Kultur dennoch mit automatisiertem Patch-

Clamping zu untersuchen, könnten die Sphäroide enzymatisch vereinzelt werden. Dabei würden jedoch die Effekte von Cytoplasmaverbindungen von benachbarten Zellen verloren gehen. Als Alternativmethode bietet sich das manuelle Patch-Clamping an, welches sich sowohl für Einzelzellen als auch für Sphäroide eignet.

Das Calciumsignalling des cholinergen Signalweges wurde in den hSGSCs mittels Calcium-Imaging quantifiziert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Unterschiede in der CHRM3-mRNA-Expression auch auf funktioneller Ebene bestehen, ohne jedoch signifikante Effekte zu zeigen. Eine getrennte Darstellung des extra- und intrazellulären Calciumeinstromes würde eine genauere Beurteilung der Effekte von 3D-Kultur und Wachstumsfaktoren zulassen. Zusätzlich dazu würde auch die Quantifizierung der Markerexpression auf Proteinebene wertvolle Informationen bringen. Eine Cofärbung von Stammzell- und Differenzierungsmarkern, insbesondere von CHRM3, würde darüber hinaus Aufschluss über die Populationsheterogenität bringen, die sich beim Calcium-Imaging gezeigt hat.

Um das Potential der hSGSCs für die Wundheilung und das Tissue-Engineering weiter zu untersuchen, könnten Zellen der 2D- und 3D-Kultur in Wundheilungsassays eingesetzt werden. Dabei wäre auch die weitere schweißdrüsen-spezifische Differenzierung der Sphäroide in der Haut untersuchenswert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Potential der hSGSCs sowohl für die Modellierung der Schweißdrüsenfunktion, als auch für die *in vitro*-Regeneration von Schweißdrüsen groß ist, und dass die 3D-Kultur ein wichtiges Werkzeug zur Regulation der Differenzierung darstellen kann. Auch für andere Zell- bzw. Gewebetypen bietet die hier verwendete Kultivierungsmethode aller Voraussicht nach eine einfache und gut reproduzierbare Möglichkeit der Differenzierungsregulation.

## 6. Literaturverzeichnis

# Literaturverzeichnis

- [Abbott, 2003] Abbott, A. (2003). Biology's new dimension. *Nature*, 424(6951):870–872. Number: 6951.
- [Akbar et al., 2010] Akbar, A., Yiangou, Y., Facer, P., Brydon, W. G., Walters, J. R. F., Anand, P., and Ghosh, S. (2010). Expression of the TRPV1 receptor differs in quiescent inflammatory bowel disease with or without abdominal pain. *Gut*, 59(6):767–774. Number: 6.
- [Akbar et al., 2008] Akbar, A., Yiangou, Y., Facer, P., Walters, J. R. F., Anand, P., and Ghosh, S. (2008). Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut*, 57(7):923–929. Number: 7.
- [Ambrosino et al., 2019] Ambrosino, P., Soldovieri, M. V., Di Zazzo, E., Paventi, G., Iannotti, F. A., Mosca, I., Miceli, F., Franco, C., Canzoniero, L. M. T., and Tagliatela, M. (2019). Activation of Kv7 Potassium Channels Inhibits Intracellular Ca<sup>2+</sup> Increases Triggered By TRPV1-Mediated Pain-Inducing Stimuli in F11 Immortalized Sensory Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18):E4322.
- [Ambrosino et al., 2013] Ambrosino, P., Soldovieri, M. V., Russo, C., and Tagliatela, M. (2013). Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPAR $\alpha$  agonist palmitoylethanolamide: PPAR $\alpha$ - and TRPV1-dependent [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase by PEA in neurons. *British Journal of Pharmacology*, 168(6):1430–1444.
- [Anada et al., 2012] Anada, T., Fukuda, J., Sai, Y., and Suzuki, O. (2012). An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials*, 33(33):8430–8441.
- [Antoni et al., 2015] Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12):5517–5527.

- [Asahina et al., 2015] Asahina, M., Poudel, A., and Hirano, S. (2015). Sweating on the palm and sole: physiological and clinical relevance. *Clinical Autonomic Research*, 25(3):153–159. Number: 3.
- [Baker, 2019] Baker, L. B. (2019). Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature*, 6(3):211–259. Number: 3.
- [Baumann et al., 2004] Baumann, T. K., Chaudhary, P., and Martenson, M. E. (2004). Background potassium channel block and TRPV1 activation contribute to proton depolarization of sensory neurons from humans with neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, 19(5):1343–1351. Number: 5.
- [Beauchamp et al., 2015] Beauchamp, P., Moritz, W., Kelm, J. M., Ullrich, N. D., Agarkova, I., Anson, B. D., Suter, T. M., and Zuppinger, C. (2015). Development and Characterization of a Scaffold-Free 3D Spheroid Model of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21(8):852–861. Number: 8.
- [Bechara, 2008] Bechara, F. G. (2008). Do we have apoeccrine sweat glands?: Letter to the Editor. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(1):67–68. Number: 1.
- [Bennett and Xie, 1988] Bennett, G. J. and Xie, Y.-K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *PAIN*, 33(1):87–107.
- [Berthiaume et al., 2011] Berthiaume, F., Maguire, T. J., and Yarmush, M. L. (2011). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(1):403–430.
- [Biedermann et al., 2010] Biedermann, T., Pontiggia, L., Böttcher-Haberzeth, S., Tharakan, S., Braziulis, E., Schiestl, C., Meuli, M., and Reichmann, E. (2010). Human Eccrine Sweat Gland Cells Can Reconstitute a Stratified Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(8):1996–2009. Number: 8.
- [Biggs et al., 2014] Biggs, J. E., Boakye, P. A., Ganesan, N., Stemkowski, P. L., Lantero, A., Ballanyi, K., and Smith, P. A. (2014). Analysis of the long-term actions of gabapentin and pregabalin in dorsal root ganglia and substantia gelatinosa. *Journal of Neurophysiology*, 112(10):2398–2412.

- [Boiron et al., 1968] Boiron, M., Guillemain, B., Bernard, C., Peries, J., and Chuat, J. C. (1968). Presence in murine sarcoma virus stocks of a 3d component which alone initiates cellular conversion. *Nature*, 219(5155):748–749. Number: 5155.
- [Boland and Dingleline, 1990a] Boland, L. M. and Dingleline, R. (1990a). Expression of sensory neuron antigens by a dorsal root ganglion cell line, F-11. *Developmental Brain Research*, 51(2):259–266.
- [Boland and Dingleline, 1990b] Boland, L. M. and Dingleline, R. (1990b). Multiple components of both transient and sustained barium currents in a rat dorsal root ganglion cell line. *The Journal of Physiology*, 420:223–245.
- [Bourinet et al., 2005] Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrere, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., McRory, J., Snutch, T. P., Eschalier, A., and Nargeot, J. (2005). Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *The EMBO Journal*, 24(2):315–324. Number: 2.
- [Bourinet et al., 2014] Bourinet, E., Altier, C., Hildebrand, M. E., Trang, T., Salter, M. W., and Zamponi, G. W. (2014). Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews*, 94(1):81–140. Number: 1.
- [Bovell, 2015] Bovell, D. (2015). The human eccrine sweat gland: Structure, function and disorders. *Journal of Local and Global Health Science*, 2015(1):5.
- [Bovell et al., 2007] Bovell, D., Corbett, A., Holmes, S., MacDonald, A., and Harker, M. (2007). The absence of apoecrine glands in the human axilla has disease pathogenetic implications, including axillary hyperhidrosis. *British Journal of Dermatology*, 156(6):1278–1286. Number: 6.
- [Bovell, 2018] Bovell, D. L. (2018). The evolution of eccrine sweat gland research towards developing a model for human sweat gland function. *Experimental Dermatology*, 27(5):544–550. Number: 5.
- [Bovell et al., 2013a] Bovell, D. L., Holub, B. S., Odusanwo, O., Brodowicz, B., Rauch, I., Kofler, B., and Lang, R. (2013a). Galanin is a modulator of eccrine sweat gland secretion. *Experimental Dermatology*, 22(2):141–143. Number: 2.
- [Bovell et al., 2009] Bovell, D. L., Kofler, B., and Lang, R. (2009). PAR-2 receptor-induced effects on human eccrine sweat gland cells. *The Journal of Medical Investigation*, 56(Supplement):371–374.

- [Bovell et al., 2013b] Bovell, D. L., Riggs, C. M., Sidlow, G., Troester, S., MacLaren, W., Yip, W., and Ko, W. H. (2013b). Evidence of purinergic neurotransmission in isolated, intact horse sweat glands. *Veterinary Dermatology*, 24(4):398–e86.
- [Buck, 2019] Buck, T. (2019). *Etablierung von Methoden Zur Funktionellen In-Vitro Charakterisierung von Schweißdrüsen Der Ratte*. Masterarbeit, Fraunhofer EMB & IMMB (UzL) Lübeck, Lübeck.
- [Cai et al., 2001] Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., and Filbin, M. T. (2001). Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(13):4731–4739.
- [Cao et al., 2010] Cao, X.-H., Byun, H.-S., Chen, S.-R., Cai, Y.-Q., and Pan, H.-L. (2010). Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor: BDNF and K<sup>+</sup> channels in diabetic neuropathy. *Journal of Neurochemistry*, pages no–no.
- [Carr and Mann, 2017] Carr, E. C. J. and Mann, E. M. (2017). *Schmerz und Schmerzmanagement - Praxishandbuch für Pflegeberufe*. Huber, 2 edition.
- [Chaicharoenaudomrung et al., 2019] Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., and Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an *in vitro* platform for cancer and stem cell modeling. *World Journal of Stem Cells*, 11(12):1065–1083. Number: 12.
- [Chambers et al., 2016] Chambers, S. M., Mica, Y., Lee, G., Studer, L., and Tomishima, M. J. (2016). Dual-SMAD Inhibition/WNT Activation-Based Methods to Induce Neural Crest and Derivatives from Human Pluripotent Stem Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1307:329–343.
- [Chandrasekaran et al., 2017] Chandrasekaran, A., Avci, H. X., Ochalek, A., Rösingh, L. N., Molnár, K., László, L., Bellák, T., Téglási, A., Pesti, K., Mike, A., Phanthong, P., Bíró, O., Hall, V., Kitiyanant, N., Krause, K.-H., Kobolák, J., and Dinnyés, A. (2017). Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 25:139–151.

- [Chen et al., 2007] Chen, W., Mi, R., Haughey, N., Oz, M., and Höke, A. (2007). Immortalization and characterization of a nociceptive dorsal root ganglion sensory neuronal line. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 12(2):121–130.
- [Clement et al., 2007] Clement, H., Odell, G., Zamudio, F. Z., Redaelli, E., Wanke, E., Alagón, A., and Possani, L. D. (2007). Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the spider *Grammostola rosea* that blocks sodium channels. *Toxicon*, 50(1):65–74.
- [Clunes et al., 2004] Clunes, M. T., Lindsay, S. L., Roussa, E., Quinton, P. M., and Bovell, D. L. (2004). Localisation of the vacuolar proton pump (V-H<sup>+</sup>-ATPase) and carbonic anhydrase II in the human eccrine sweat gland. *Journal of Molecular Histology*, 35(4):339–345. Number: 4.
- [Concepcion et al., 2016] Concepcion, A. R., Vaeth, M., Wagner, L. E., Eckstein, M., Hecht, L., Yang, J., Crottes, D., Seidl, M., Shin, H. P., Weidinger, C., Cameron, S., Turvey, S. E., Issekutz, T., Meyts, I., Lacruz, R. S., Cuk, M., Yule, D. I., and Feske, S. (2016). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry regulates Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels and eccrine sweat gland function. *Journal of Clinical Investigation*, 126(11):4303–4318. Number: 11.
- [Costigan et al., 2009] Costigan, M., Scholz, J., and Woolf, C. J. (2009). Neuropathic Pain. *Annual review of neuroscience*, 32:1–32.
- [Cruciani et al., 1994] Cruciani, R. A., Dvorkin, B., Klinger, H. P., and Makman, M. H. (1994). Presence in neuroblastoma cells of a  $\mu_3$  receptor with selectivity for opiate alkaloids but without affinity for opioid peptides. *Brain Research*, 667(2):229–237.
- [Cruciani et al., 1993] Cruciani, R. A., Dvorkin, B., Morris, S. A., Crain, S. M., and Makman, M. H. (1993). Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7):3019–3023.
- [Cui et al., 2012] Cui, C.-Y., Childress, V., Piao, Y., Michel, M., Johnson, A. A., Kunisada, M., Ko, M. S. H., Kaestner, K. H., Marmorstein, A. D., and Schlessinger, D. (2012). Forkhead transcription factor FoxA1 regulates sweat secretion through Bestrophin 2 anion channel and Na-K-Cl cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4):1199–1203. Number: 4.

- [Cui and Schlessinger, 2015] Cui, C.-Y. and Schlessinger, D. (2015). Eccrine sweat gland development and sweat secretion. *Experimental Dermatology*, 24(9):644–650. Number: 9.
- [Cui and Schlessinger, 2017] Cui, C.-Y. and Schlessinger, D. (2017). Neuropeptide PACAP promotes sweat secretion. *The British Journal of Dermatology*, 176(2):295–296.
- [Curcio et al., 2007] Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E., and Bader, A. (2007). Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*, 28(36):5487–5497.
- [Danner et al., 2012] Danner, S., Kremer, M., Petschnik, A. E., Nagel, S., Zhang, Z., Hopfner, U., Reckhenrich, A. K., Weber, C., Schenck, T. L., Becker, T., Kruse, C., Machens, H.-G., and Egaña, J. T. (2012). The use of human sweat gland-derived stem cells for enhancing vascularization during dermal regeneration. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(6):1707–1716.
- [Desai et al., 2006] Desai, A., Kisaalita, W. S., Keith, C., and Wu, Z.-Z. (2006). Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell culture and differentiation in 3-D collagen hydrogels for cell-based biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8):1483–1492.
- [Devor, 2009] Devor, M. (2009). Ectopic discharge in A $\beta$  afferents as a source of neuropathic pain. *Experimental Brain Research*, 196(1):115–128. Number: 1.
- [di Sant’Agnese et al., 1953] di Sant’Agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A., and Shear, E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in Cystic Fibrose of the pancreas: Clinical Significance and Relationship to the Disease. *Pediatrics*, 12(5):549–563.
- [Dionisi et al., 2020] Dionisi, C., Rai, M., Chazalon, M., Schiffmann, S. N., and Pandolfo, M. (2020). Primary proprioceptive neurons from human induced pluripotent stem cells: a cell model for afferent ataxias. *Scientific Reports*, 10(1):7752.
- [Doran et al., 2015] Doran, C., Chetrit, J., Holley, M. C., Grundy, D., and Nassar, M. A. (2015). Mouse DRG Cell Line with Properties of Nociceptors. *PLOS ONE*, 10(6):e0128670.
- [Drenckhahn and Benninghoff, 2009] Drenckhahn, D. and Benninghoff (2009). *Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, volume 2. Elsevier, 16 edition.

- [Dunlop et al., 2009] Dunlop, J., Vasilyev, D., Lu, P., Cummons, T., and Bowlby, M. (2009). Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels and Pain. *Current Pharmaceutical Design*, 15(15):1767–1772. Number: 15.
- [Dworkin et al., 2003] Dworkin, R. H., Backonja, M., Rowbotham, M. C., Allen, R. R., Argoff, C. R., Bennett, G. J., Bushnell, M. C., Farrar, J. T., Galer, B. S., Haythornthwaite, J. A., Hewitt, D. J., Loeser, J. D., Max, M. B., Saltarelli, M., Schmader, K. E., Stein, C., Thompson, D., Turk, D. C., Wallace, M. S., Watkins, L. R., and Weinstein, S. M. (2003). Advances in Neuropathic Pain: Diagnosis, Mechanisms, and Treatment Recommendations. *Archives of Neurology*, 60(11):1524. Number: 11.
- [Edmondson et al., 2014] Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., and Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4):207–218.
- [Eisenberg and Levanon, 2013] Eisenberg, E. and Levanon, E. Y. (2013). Human house-keeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10):569–574.
- [Emery et al., 2011] Emery, E. C., Young, G. T., Berrococo, E. M., Chen, L., and McNaughton, P. A. (2011). HCN2 Ion Channels Play a Central Role in Inflammatory and Neuropathic Pain. *Science*, 333(6048):1462–1466. Number: 6048.
- [Ericsson et al., 2013] Ericsson, A. C., Crim, M. J., and Franklin, C. L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri Medicine*, 110(3):201–205.
- [Ertongur-Fauth et al., 2014] Ertongur-Fauth, T., Hochheimer, A., Buescher, J. M., Rappich, S., and Krohn, M. (2014). A novel *TMEM16A* splice variant lacking the dimerization domain contributes to calcium-activated chloride secretion in human sweat gland epithelial cells. *Experimental Dermatology*, 23(11):825–831. Number: 11.
- [Fan et al., 1992] Fan, S. F., Shen, K. F., Scheideler, M. A., and Crain, S. M. (1992). F11 neuroblastoma × DRG neuron hybrid cells express inhibitory  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors which increase voltage-dependent  $K^+$  currents upon activation. *Brain Research*, 590(1):329–333.
- [Ferreira et al., 2019] Ferreira, J. N., Hasan, R., Urkasemsin, G., Ng, K. K., Adine, C., Muthumariappan, S., and Souza, G. R. (2019). A magnetic three-dimensional levitated primary cell culture system for the development of secretory salivary gland-like organoids. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(3):495–508.

- [Fioravanti et al., 2008] Fioravanti, B., De Felice, M., Stucky, C. L., Medler, K. A., Luo, M.-C., Gardell, L. R., Ibrahim, M., Malan, T. P., Yamamura, H. I., Ossipov, M. H., King, T., Lai, J., Porreca, F., and Vanderah, T. W. (2008). Constitutive Activity at the Cannabinoid CB1 Receptor Is Required for Behavioral Response to Noxious Chemical Stimulation of TRPV1: Antinociceptive Actions of CB1 Inverse Agonists. *Journal of Neuroscience*, 28(45):11593–11602.
- [Forsythe et al., 2002] Forsythe, S. M., Kogut, P. C., McConville, J. F., Fu, Y., McCauley, J. A., Halayko, A. J., Liu, H. W., Kao, A., Fernandes, D. J., Bellam, S., Fuchs, E., Sinha, S., Bell, G. I., Camoretti-Mercado, B., and Solway, J. (2002). Structure and Transcription of the Human m3 Muscarinic Receptor Gene. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(3):298–305.
- [Francel et al., 1987] Francel, P. C., Harris, K., Smith, M., Fishman, M. C., Dawson, G., and Miller, R. J. (1987). Neurochemical Characteristics of a Novel Dorsal Root Ganglion X Neuroblastoma Hybrid Cell Line, F-11. *Journal of Neurochemistry*, 48(5):1624–1631.
- [Fujii et al., 2016] Fujii, N., Louie, J. C., McNeely, B. D., Zhang, S. Y., Tran, M.-A., and Kenny, G. P. (2016). K<sup>+</sup> channel mechanisms underlying cholinergic cutaneous vasodilation and sweating in young humans: roles of K<sub>Ca</sub>, K<sub>ATP</sub>, and K<sub>V</sub> channels? *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 311(3):R600–R606.
- [Fukuda and Mikoshiba, 2000] Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (2000). Expression of synaptotagmin I or II promotes neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience Letters*, 295(1-2):33–36. Number: 1-2.
- [Gao et al., 2014] Gao, Y., Li, M., Zhang, X., Bai, T., Chi, G., Liu, J. Y., and Li, Y. (2014). Isolation, culture and phenotypic characterization of human sweat gland epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(4):997–1003.
- [Gauer and Meyers, 2019] Gauer, R. and Meyers, B. K. (2019). Heat-Related Illnesses. *American Family Physician*, 99(8):482–489.
- [Genç et al., 2005] Genç, B., Ulupinar, E., and Erzurumlu, R. S. (2005). Differential Trk expression in explant and dissociated trigeminal ganglion cell cultures. *Journal of Neurobiology*, 64(2):145–156.

- [Geuna et al., 2016] Geuna, S., Raimondo, S., Fregnan, F., Haastert-Talini, K., and Grothe, C. (2016). In vitro models for peripheral nerve regeneration. *European Journal of Neuroscience*, 43(3):287–296.
- [Ghil et al., 2000] Ghil, S.-H., Kim, B.-J., Lee, Y.-D., and Suh-Kim, H. (2000). Neurite Outgrowth Induced by Cyclic AMP Can Be Modulated by the  $\alpha$  Subunit of Go. *Journal of Neurochemistry*, 74(1):151–158.
- [Ginting et al., 2011] Ginting, J. V., Tripp, D. A., Nickel, J. C., Fitzgerald, M. P., and Mayer, R. (2011). Spousal support decreases the negative impact of pain on mental quality of life in women with interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *BJU International*, 108(5):713–717.
- [Guo et al., 2014] Guo, L., Zhou, Y., Wang, S., and Wu, Y. (2014). Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(10):2009–2019.
- [Haberberger et al., 2020] Haberberger, R. V., Barry, C., and Matusica, D. (2020). Immortalized Dorsal Root Ganglion Neuron Cell Lines. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14.
- [Hackam and Redelmeier, 2006] Hackam, D. G. and Redelmeier, D. A. (2006). Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA*, 296(14):1731–1732. Number: 14.
- [Hashemian et al., 2017] Hashemian, S., Alhouayek, M., and Fowler, C. J. (2017). TLR4 receptor expression and function in F11 dorsal root ganglion  $\times$  neuroblastoma hybrid cells. *Innate Immunity*, 23(8):687–696.
- [He et al., 2014] He, C., Chen, F., Li, B., and Hu, Z. (2014). Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology*, 112:1–23.
- [Hellemans et al., 2007] Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2):R19.
- [Henrich et al., 2002] Henrich, M., Hoffmann, K., König, P., Gruss, M., Fischbach, T., Gödecke, A., Hempelmann, G., and Kummer, W. (2002). Sensory neurons respond to

- hypoxia with NO production associated with mitochondria. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 20(2):307–322.
- [Hirschhaeuser et al., 2010] Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, 148(1):3–15.
- [Holmgren et al., 2015] Holmgren, G., Ghosheh, N., Zeng, X., Bogestål, Y., Sartipy, P., and Synnergren, J. (2015). Identification of stable reference genes in differentiating human pluripotent stem cells. *Physiological Genomics*, 47(6):232–239.
- [Holtfreter, 1944] Holtfreter, J. (1944). A study of the mechanics of gastrulation. *Journal of Experimental Zoology*, 95(2):171–212.
- [Hu et al., 2018] Hu, Y., Converse, C., Lyons, M., and Hsu, W. (2018). Neural control of sweat secretion: a review. *British Journal of Dermatology*, 178(6):1246–1256. Number: 6.
- [Hubka et al., 2015] Hubka, K. M., Wu, D., Harrington, D. A., Langer, J. C., Pocard, T., Jammayrac, O., Farach-Carson, M. C., and Pradhan-Bhatt, S. (2015). Dissociative and Nondissociative Models for Culture of Human Eccrine Glands for Toxicology Testing and Tissue Engineering Applications. *Applied In Vitro Toxicology*, 1(3):187–197. Number: 3.
- [Hutchinson and Kirk, 2011] Hutchinson, L. and Kirk, R. (2011). High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(4):189–190. Number: 4.
- [Inoue et al., 2013] Inoue, R., Sohara, E., Rai, T., Satoh, T., Yokozeki, H., Sasaki, S., and Uchida, S. (2013). Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *Journal of Dermatological Science*, 70(1):26–33. Number: 1.
- [Inoue and Shibasaki, 1996] Inoue, Y. and Shibasaki, M. (1996). Regional differences in age-related decrements of the cutaneous vascular and sweating responses to passive heating. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 74(1-2):78–84. Number: 1-2.
- [Irfan-Maqsood et al., 2013] Irfan-Maqsood, M., Matin, M. M., Bahrami, A. R., and Ghasroldasht, M. M. (2013). Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment: Immortality of cell lines. *Cell Biology International*, 37(10):1038–1045.

- [Jagodic et al., 2007] Jagodic, M. M., Pathirathna, S., Nelson, M. T., Mancuso, S., Joksovic, P. M., Rosenberg, E. R., Bayliss, D. A., Jevtovic-Todorovic, V., and Todorovic, S. M. (2007). Cell-Specific Alterations of T-Type Calcium Current in Painful Diabetic Neuropathy Enhance Excitability of Sensory Neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(12):3305–3316. Number: 12.
- [Jahnel et al., 2003] Jahnel, R., Bender, O., Münter, L. M., Dreger, M., Gillen, C., and Hucho, F. (2003). Dual expression of mouse and rat VRL-1 in the dorsal root ganglion derived cell line F-11 and biochemical analysis of VRL-1 after heterologous expression: Co-expression of mouse and rat VRL-1 in F-11 cells. *European Journal of Biochemistry*, 270(21):4264–4271.
- [Jones and Kealey, 1987] Jones, C. J. and Kealey, T. (1987). Electrophysiological and dye-coupling studies on secretory, myoepithelial and duct cells in human eccrine sweat glands. *The Journal of Physiology*, 389:461–481.
- [Jones-Villeneuve et al., 1982] Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A., and Kalnins, V. I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of Cell Biology*, 94(2):253–262. Number: 2.
- [Kabashima et al., 2008] Kabashima, K., Shimauchi, T., Kobayashi, M., Fukamachi, S., Kawakami, C., Ogata, M., Kabashima, R., Mori, T., Ota, T., Fukushima, S., Hara-Chikuma, M., and Tokura, Y. (2008). Aberrant aquaporin 5 expression in the sweat gland in aquagenic wrinkling of the palms. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(2):S28–S32. Number: 2.
- [Kabayama et al., 1999] Kabayama, H., Takei, K., Fukuda, M., Ibata, K., and Mikoshiba, K. (1999). Functional involvement of synaptotagmin I/II C2A domain in neurite outgrowth of chick dorsal root ganglion neuron. *Neuroscience*, 88(4):999–1003.
- [Kanai et al., 2007] Kanai, Y., Hara, T., Imai, A., and Sakakibara, A. (2007). Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(5):733–738. Number: 5.
- [Klaka, 2017] Klaka, P. (2017). *Entwicklung eines rekonstruierten dreidimensionalen Schweißdrüsenmodells*. PhD Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.

- [Klaka et al., 2017] Klaka, P., Grödl, S., Banowski, B., Giesen, M., Sättler, A., Proksch, P., Welss, T., and Förster, T. (2017). A novel organotypic 3D sweat gland model with physiological functionality. *PLOS ONE*, 12(8):e0182752. Number: 8.
- [Klar et al., 2014] Klar, J., Hisatsune, C., Baig, S. M., Tariq, M., Johansson, A. C., Rasool, M., Malik, N. A., Ameer, A., Sugiura, K., Feuk, L., Mikoshiba, K., and Dahl, N. (2014). Abolished InsP3R2 function inhibits sweat secretion in both humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 124(11):4773–4780. Number: 11.
- [Ko et al., 2002] Ko, M.-H., Chen, W.-P., and Hsieh, S.-T. (2002). Neuropathology of Skin Denervation in Acrylamide-Induced Neuropathy. *Neurobiology of Disease*, 11(1):155–165.
- [Kouranova et al., 2008] Kouranova, E., Strassle, B., Ring, R., Bowlby, M., and Vasilyev, D. (2008). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA and protein expression in large versus small diameter dorsal root ganglion neurons: Correlation with hyperpolarization-activated current gating. *Neuroscience*, 153(4):1008–1019. Number: 4.
- [Krogh, 1929] Krogh, A. (1929). The Progress of Physiology. *Science*, 70(1809):200–204. Number: 1809.
- [Kruse et al., 2006] Kruse, C., Bodó, E., Petschnik, A. E., Danner, S., Tiede, S., and Paus, R. (2006). Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin? *Experimental Dermatology*, 15(10):794–800.
- [Kumazawa et al., 1994] Kumazawa, K., Sobue, G., Mitsuma, T., and Ogawa, T. (1994). Modulatory effects of calcitonin gene-related peptide and substance P on human cholinergic sweat secretion. *Clinical Autonomic Research*, 4(6):319–322. Number: 6.
- [Kuner and Flor, 2017] Kuner, R. and Flor, H. (2017). Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1):20–30. Number: 1.
- [Kusano and Gainer, 1993] Kusano, K. and Gainer, H. (1993). Modulation of voltage-activated Ca currents by pain-inducing agents in a dorsal root ganglion neuronal line, F-11. *Journal of Neuroscience Research*, 34(2):158–169.

- [Labows et al., 1979] Labows, J. N., Preti, G., Hoelzle, E., Leyden, J., and Kligman, A. (1979). Steroid analysis of human apocrine secretion. *Steroids*, 34(3):249–258. Number: 3.
- [Lang and Bickel, 1970] Lang, K. and Bickel, H. (1970). [Tolerance of 5-hydroxymethylfurfural (HMF). 3d communication: examination of cytotoxic effect of chick embryo fibroblasts]. *Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft*, 10(2):153–154. Number: 2.
- [Le Gall-Ianotto et al., 2012] Le Gall-Ianotto, C., Andres, E., Hurtado, S., Pereira, U., and Misery, L. (2012). Characterization of the first coculture between human primary keratinocytes and the dorsal root ganglion-derived neuronal cell line F-11. *Neuroscience*, 210:47–57.
- [Leadley et al., 2012] Leadley, R. M., Armstrong, N., Lee, Y. C., Allen, A., and Kleijnen, J. (2012). Chronic Diseases in the European Union: The Prevalence and Health Cost Implications of Chronic Pain. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, 26(4):310–325. Number: 4.
- [Lee and Dessi, 1989] Lee, C. M. and Dessi, J. (1989). NCL-SG3: a human eccrine sweat gland cell line that retains the capacity for transepithelial ion transport. *Journal of Cell Science*, 92 ( Pt 2):241–249.
- [Lee et al., 2013] Lee, J. M., Mhaweche-Fauceglia, P., Lee, N., Cristina Parsanian, L., Gail Lin, Y., Andrew Gayther, S., and Lawrenson, K. (2013). A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Laboratory Investigation*, 93(5):528–542.
- [Lee and Mack, 2006] Lee, K. and Mack, G. W. (2006). Role of nitric oxide in methacholine-induced sweating and vasodilation in human skin. *Journal of Applied Physiology*, 100(4):1355–1360. Number: 4.
- [Lee et al., 2002] Lee, P. D., Sladek, R., Greenwood, C. M. T., and Hudson, T. J. (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Research*, 12(2):292–297.
- [Li et al., 2015] Li, H., Chen, L., Zeng, S., Li, X., Zhang, X., Lin, C., Zhang, M., Xie, S., He, Y., Shu, S., Yang, L., Tang, S., and Fu, X. (2015). Matrigel basement membrane matrix induces eccrine sweat gland cells to reconstitute sweat gland-like structures in nude mice. *Experimental Cell Research*, 332(1):67–77.

- [Li et al., 2002] Li, J., Fu, X., Sun, X., Sun, T., and Sheng, Z. (2002). The Interaction between Epidermal Growth Factor and Matrix Metalloproteinases Induces the Development of Sweat Glands in Human Fetal Skin. *Journal of Surgical Research*, 106(2):258–263.
- [Liang et al., 2016] Liang, H., Sun, Q., Zhen, Y., Li, F., Xu, Y., Liu, Y., Zhang, X., and Qin, M. (2016). The differentiation of amniotic fluid stem cells into sweat glandlike cells is enhanced by the presence of Sonic hedgehog in the conditioned medium. *Experimental Dermatology*, 25(9):714–720.
- [Liao et al., 2019] Liao, T., Lehmann, J., Sternstein, S., Yay, A., Zhang, G., Matthießen, A. E., Schumann, S., Siemers, F., Kruse, C., Hundt, J. E., Langan, E. A., Tiede, S., and Paus, R. (2019). Nestin+ progenitor cells isolated from adult human sweat gland stroma promote reepithelialisation and may stimulate angiogenesis in wounded human skin ex vivo. *Archives of Dermatological Research*, 311(4):325–330.
- [Lim et al., 2011] Lim, B., Ju, H., Kim, M., and Kang, C. (2011). Increased genetic susceptibility to intestinal-type gastric cancer is associated with increased activity of the RUNX3 distal promoter. *Cancer*, 117(22):5161–5171.
- [Lin and Chang, 2008] Lin, R.-Z. and Chang, H.-Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9-10):1172–1184.
- [Lindsay, 1988] Lindsay, R. M. (1988). Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(7):2394–2405.
- [Lindsay et al., 2008] Lindsay, S., Holmes, S., Corbett, A., Harker, M., and Bovell, D. (2008). Innervation and receptor profiles of the human apocrine (epitrichial) sweat gland: routes for intervention in bromhidrosis. *British Journal of Dermatology*, 159(3):653–660. Number: 3.
- [Longmore et al., 1986] Longmore, J., Jani, B., Bradshaw, C., and Szabadi, E. (1986). Effects of locally administered anticholinesterase agents on the secretory response of human eccrine sweat glands to acetylcholine and carbachol. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 21(2):131–135.
- [Lonsdale-Eccles et al., 2003] Lonsdale-Eccles, A., Leonard, N., and Lawrence, C. (2003).

- Axillary hyperhidrosis: eccrine or apocrine? *Clinical and Experimental Dermatology*, 28(1):2–7.
- [Louie et al., 2016] Louie, J. C., Fujii, N., Meade, R. D., and Kenny, G. P. (2016). The roles of the Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> -ATPase, NKCC, and K<sup>+</sup> channels in regulating local sweating and cutaneous blood flow during exercise in humans in vivo. *Physiological Reports*, 4(22):e13024.
- [Louie et al., 2017] Louie, J. C., Fujii, N., Meade, R. D., McNeely, B. D., and Kenny, G. P. (2017). The roles of K<sub>Ca</sub>, K<sub>ATP</sub>, and K<sub>V</sub> channels in regulating cutaneous vasodilation and sweating during exercise in the heat. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312(5):R821–R827.
- [Lykissas et al., 2007] Lykissas, M., Batistatou, A., Charalabopoulos, K., and Beris, A. (2007). The Role of Neurotrophins in Axonal Growth, Guidance, and Regeneration. *Current Neurovascular Research*, 4(2):143–151. Number: 2.
- [Lynn et al., 2012] Lynn, A. G., Gagnon, D., Binder, K., Boushel, R. C., and Kenny, G. P. (2012). Divergent roles of plasma osmolality and the baroreflex on sweating and skin blood flow. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(5):R634–R642. Number: 5.
- [Ma et al., 2018] Ma, Y., Li, M., Liu, J., Pang, C., Zhang, J., Li, Y., and Fu, X. (2018). Location, Isolation, and Identification of Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Sweat Glands. *Stem Cells International*, 2018:1–12.
- [Mackinnon, 1954] Mackinnon, P. C. B. (1954). VARIATIONS WITH AGE IN THE NUMBER OF ACTIVE PALMAR DIGITAL SWEAT GLANDS. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 17(2):124–126. Number: 2.
- [Manion et al., 2019] Manion, J., Waller, M. A., Clark, T., Massingham, J. N., and Neely, G. G. (2019). Developing Modern Pain Therapies. *Frontiers in Neuroscience*, 13:1370.
- [Manis, 2015] Manis, P. B. (2015). Delayed Rectifier and A-Type Potassium Channels. In Jaeger, D. and Jung, R., editors, *Encyclopedia of Computational Neuroscience*, pages 971–985. Springer, New York, NY.
- [Marieb and Hoehn, 2010] Marieb, E. N. and Hoehn, K. N. (2010). *Human Anatomy & Physiology*. Pearson, 10 edition.

- [Marsh et al., 2012] Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L., and Lawson, S. N. (2012). Leak K<sup>+</sup> channel mRNAs in dorsal root ganglia: Relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 49(3):375–386.
- [Martin et al., 2002] Martin, D. J., McClelland, D., Herd, M. B., Sutton, K. G., Hall, M. D., Lee, K., Pinnock, R. D., and Scott, R. H. (2002). Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel currents in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and channel subunit expression. *Neuropharmacology*, 42(3):353–366.
- [Martini et al., 2012] Martini, F. H., Timmons, M. J., and Tallitsch, R. B. (2012). *Anatomie - 6. Auflage (Pearson)*. Pearson, 6 edition.
- [Matsui et al., 2014] Matsui, S., Murota, H., Takahashi, A., Yang, L., Lee, J.-B., Omiya, K., Ohmi, M., Kikuta, J., Ishii, M., and Katayama, I. (2014). Dynamic Analysis of Histamine-Mediated Attenuation of Acetylcholine-Induced Sweating via GSK3 $\beta$  Activation. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2):326–334. Number: 2.
- [McBeath et al., 2004] McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., and Chen, C. S. (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell*, 6(4):483–495.
- [Mehnert et al., 2014] Mehnert, J. M., Kisch, T., and Brandenburger, M. (2014). Co-culture systems of human sweat gland derived stem cells and peripheral nerve cells: an in vitro approach for peripheral nerve regeneration. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 34(4):1027–1037.
- [Menard et al., 2018] Menard, M., Costechareyre, C., Coelho-Aguiar, J. M., Jarrosson-Wuilleme, L., Rama, N., Blachier, J., Kindbeiter, K., Bozon, M., Cabrera, J. R., Dupin, E., Le Douarin, N., Mehlen, P., and Tauszig-Delamasure, S. (2018). The dependence receptor TrkC regulates the number of sensory neurons during DRG development. *Developmental Biology*, 442(2):249–261. Number: 2.
- [Metzler-Wilson et al., 2014] Metzler-Wilson, K., Sammons, D. L., Ossim, M. A., Metzger, N. R., Jurovcik, A. J., Krause, B. A., and Wilson, T. E. (2014). Extracellular calcium chelation and attenuation of calcium entry decrease *in vivo* cholinergic-induced eccrine sweating sensitivity in humans: Calcium and eccrine sweating. *Experimental Physiology*, 99(2):393–402. Number: 2.

- [Michiak-Mikolajczak, 1984] Michiak-Mikolajczak, B. (1984). Sweat production in the isolated eccrine sweat gland of the rat. *British Journal of Dermatology*, 111(3):309–314. Number: 3.
- [Montminy et al., 1990] Montminy, M. R., Gonzalez, G. A., and Yamamoto, K. K. (1990). Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends in Neurosciences*, 13(5):184–188.
- [Moqrich et al., 2004] Moqrich, A., Earley, T. J., Watson, J., Andahazy, M., Backus, C., Martin-Zanca, D., Wright, D. E., Reichardt, L. F., and Patapoutian, A. (2004). Expressing TrkC from the TrkA locus causes a subset of dorsal root ganglia neurons to switch fate. *Nature Neuroscience*, 7(8):812–818. Number: 8.
- [Mork et al., 1996] Mork, A.-C., Von Euler, A., Roomans, G. M., and Ring, A. (1996). cAMP-induced chloride transport in NCL-SG3 sweat gland cells. *Acta Physiologica Scandinavica*, 157(1):21–32. Number: 1.
- [Moscona and Moscona, 1952] Moscona, A. and Moscona, H. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy*, 86(3):287–301.
- [Murphy et al., 2019] Murphy, G. R., Dunstan, R. H., Macdonald, M. M., Borges, N., Radford, Z., Sparkes, D. L., Dascombe, B. J., and Roberts, T. K. (2019). Relationships between electrolyte and amino acid compositions in sweat during exercise suggest a role for amino acids and K<sup>+</sup> in reabsorption of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> from sweat. *PLOS ONE*, 14(10):e0223381. Number: 10.
- [Nagel, 2013] Nagel, S. (2013). *Charakterisierung einer Nestin-positiven Stammzellpopulation aus humanen Schweißdrüsen*. PhD Thesis, Zentrale Hochschulbibliothek Lübeck, Lübeck.
- [Naruse et al., 1992] Naruse, K., McGehee, D. S., and Oxford, G. S. (1992). Differential responses of Ca-activated K channels to bradykinin in sensory neurons and F-11 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 262(2):C453–C460.
- [Nejsum et al., 2002] Nejsum, L. N., Kwon, T.-H., Jensen, U. B., Fumagalli, O., Frokiaer, J., Krane, C. M., Menon, A. G., King, L. S., Agre, P. C., and Nielsen, S. (2002). Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1):511–516. Number: 1.

- [Nejsum et al., 2005] Nejsum, L. N., Praetorius, J., and Nielsen, S. (2005). NKCC1 and NHE1 are abundantly expressed in the basolateral plasma membrane of secretory coil cells in rat, mouse, and human sweat glands. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289(2):C333–C340.
- [Neureiter et al., 2022] Neureiter, A., Eberhardt, E., and Lampert, A. (2022). Differentiation of iPS-Cells into Peripheral Sensory Neurons. In Kannan, N. and Beer, P., editors, *Stem Cell Assays: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, pages 175–188. Springer US, New York, NY.
- [O’Brien and Meisler, 2013] O’Brien, J. E. and Meisler, M. H. (2013). Sodium channel SCN8A (Nav1.6): properties and de novo mutations in epileptic encephalopathy and intellectual disability. *Frontiers in Genetics*, 4.
- [Ogihara et al., 2016] Ogihara, Y., Masuda, T., Ozaki, S., Yoshikawa, M., and Shiga, T. (2016). Runx3-regulated expression of two Ntrk3 transcript variants in dorsal root ganglion neurons: Runx3-Regulated Expression of Ntrk3s. *Developmental Neurobiology*, 76(3):313–322.
- [Ogunlana et al., 2015] Ogunlana, M. O., Odole, A. C., Adejumo, A., and Odunaiya, N. (2015). Catastrophising, pain, and disability in patients with nonspecific low back pain. *Hong Kong Physiotherapy Journal: Official Publication of the Hong Kong Physiotherapy Association Limited = Wu Li Chih Liao*, 33(2):73–79.
- [Park and Ryu, 2018] Park, Y. and Ryu, J.-K. (2018). Models of synaptotagmin-1 to trigger  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent vesicle fusion. *FEBS Letters*, 592(21):3480–3492. Number: 21.
- [Pastori et al., 2019] Pastori, V., D’Aloia, A., Blasa, S., and Lecchi, M. (2019). Serum-deprived differentiated neuroblastoma F-11 cells express functional dorsal root ganglion neuron properties. *PeerJ*, 7.
- [Paterno et al., 1997] Paterno, G. D., Gillespie, L. L., Julien, J.-P., and Skup, D. (1997). Regulation of neurofilament L, M and H gene expression during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Molecular Brain Research*, 49(1-2):247–254.
- [Petschnik, 2011] Petschnik, A. (2011). *Xenogene Kokultur zur Induktion der neuronalen Differenzierung in humanen glandulären und Haut-abgeleiteten Stammzellen*. PhD Thesis, Universität zu Lübeck, Lübeck.

- [Petschnik et al., 2010] Petschnik, A., Klatte, J., Evers, L., Kruse, C., Paus, R., and Danner, S. (2010). Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *British Journal of Dermatology*, 162(2):380–383.
- [Petschnik et al., 2011] Petschnik, A. E., Fell, B., Tiede, S., Habermann, J. K., Pries, R., Kruse, C., and Danner, S. (2011). A novel xenogeneic co-culture system to examine neuronal differentiation capability of various adult human stem cells. *PLoS One*, 6(9):e24944.
- [Platika et al., 1985a] Platika, D., Baizer, L., and Fishman, M. C. (1985a). Sensory neurons immortalized by fusion with neuroblastoma cells. *Transactions of the Association of American Physicians*, 98:301–304.
- [Platika et al., 1985b] Platika, D., Boulos, M. H., Baizer, L., and Fishman, M. C. (1985b). Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10):3499–3503.
- [Purves et al., 2018] Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A.-S., Mooney, R. D., Platt, M. L., and White, L. E. (2018). *Neuroscience*. Oxford University Press, New York, 6 edition.
- [Quinton, 1983] Quinton, P. M. (1983). Sweating and its Disorders. *Annual Review of Medicine*, 34(1):429–452.
- [Quinton, 2007] Quinton, P. M. (2007). Cystic Fibrosis: Lessons from the Sweat Gland. *Physiology*, 22(3):212–225.
- [Quinton and Reddy, 1992] Quinton, P. M. and Reddy, M. M. (1992). Control of CF-TR chloride conductance by ATP levels through non-hydrolytic binding. *Nature*, 360(6399):79–81.
- [Radat et al., 2013] Radat, F., Margot-Duclot, A., and Attal, N. (2013). Psychiatric comorbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: a multicentre cohort study. *European Journal of Pain (London, England)*, 17(10):1547–1557.
- [Rall and Sutherland, 1961] Rall, T. W. and Sutherland, E. W. (1961). The regulatory role of adenosine-3', 5'-phosphate. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 26:347–354.

- [Raymon et al., 1999] Raymon, H. K., Thode, S., Zhou, J., Friedman, G. C., Pardinas, J. R., Barrere, C., Johnson, R. M., and Sah, D. W. (1999). Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(13):5420–5428.
- [Reddy and Quinton, 2003] Reddy, M. and Quinton, P. (2003). Functional interaction of CFTR and ENaC in sweat glands. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 445(4):499–503. Number: 4.
- [Reddy and Quinton, 1992] Reddy, M. M. and Quinton, P. M. (1992). Electrophysiologically distinct cell types in human sweat gland secretory coil. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 262(2):C287–C292.
- [Rimmerman et al., 2008] Rimmerman, N., Bradshaw, H. B., Hughes, H. V., Chen, J. S.-C., Hu, S. S.-J., McHugh, D., Vefring, E., Jahnsen, J. A., Thompson, E. L., Masuda, K., Cravatt, B. F., Burstein, S., Vasko, M. R., Prieto, A. L., O’Dell, D. K., and Walker, J. M. (2008). N-palmitoyl glycine, a novel endogenous lipid that acts as a modulator of calcium influx and nitric oxide production in sensory neurons. *Molecular Pharmacology*, 74(1):213–224.
- [Rittié, 2016] Rittié, L. (2016). Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10(2):103–120.
- [Roisen et al., 1972] Roisen, F. J., Murphy, R. A., Pichichero, M. E., and Braden, W. G. (1972). Cyclic adenosine monophosphate stimulation of axonal elongation. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4017):73–74.
- [Rosker et al., 2007] Rosker, C., Lohberger, B., Hofer, D., Steinecker, B., Quasthoff, S., and Schreibmayer, W. (2007). The TTX metabolite 4,9-anhydro-TTX is a highly specific blocker of the Na<sub>v</sub>1.6 voltage-dependent sodium channel. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(2):C783–C789.
- [Ross et al., 2001] Ross, R. A., Coutts, A. A., McFarlane, S. M., Anavi-Goffer, S., Irving, A. J., Pertwee, R. G., MacEwan, D. J., and Scott, R. H. (2001). Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*, 40(2):221–232.
- [Russel and Burch, 1960] Russel, W. M. S. and Burch, R. L. (1960). *The Principles of Humane Experimental Technique*, volume 1. Methuen, London.

- [Saint-Criq and Gray, 2017] Saint-Criq, V. and Gray, M. A. (2017). Role of CFTR in epithelial physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(1):93–115.
- [Sato, 1977] Sato, K. (1977). The physiology, pharmacology, and biochemistry of the eccrine sweat gland. In Adrian, R. H., Helmreich, E., Holzer, H., Jung, R., Kramer, K., Krayer, O., Linden, R. J., Lynen, F., Miescher, P. A., Piiper, J., Rasmussen, H., Renold, A. E., Trendelenburg, U., Ullrich, K., Vogt, W., and Weber, A., editors, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 79*, volume 79, pages 51–131. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. Book Authors: \_:n1144 Series Editors: \_:n1127.
- [Sato et al., 1989] Sato, K., Kang, W., Saga, K., and Sato, K. (1989). Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 20(4):537–563. Number: 4.
- [Sato et al., 1987] Sato, K., Leidal, R., and Sato, F. (1987). Morphology and development of an apoecrine sweat gland in human axillae. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 252(1):R166–R180. Number: 1.
- [Sato and Sato, 1981] Sato, K. and Sato, F. (1981). Pharmacologic responsiveness of isolated single eccrine sweat glands. *The American Journal of Physiology*, 240(1):R44–51.
- [Sato and Sato, 1983a] Sato, K. and Sato, F. (1983a). Cholinergic potentiation of isoproterenol-induced cAMP level in sweat gland. *The American Journal of Physiology*, 245(3):C189–195.
- [Sato and Sato, 1983b] Sato, K. and Sato, F. (1983b). Individual variations in structure and function of human eccrine sweat gland. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 245(2):R203–R208. Number: 2.
- [Sato and Sato, 1984] Sato, K. and Sato, F. (1984). Defective beta adrenergic response of cystic fibrosis sweat glands in vivo and in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 73(6):1763–1771. Number: 6.
- [Sato and Sato, 1987] Sato, K. and Sato, F. (1987). Sweat secretion by human axillary apoecrine sweat gland in vitro. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 252(1):R181–R187. Number: 1.
- [Schitteck et al., 2001] Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G., and Garbe, C.

- (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology*, 2(12):1133–1137. Number: 12.
- [Schmidt et al., 1992] Schmidt, J. W., Brugge, J. S., and Nelson, W. J. (1992). pp60src tyrosine kinase modulates P19 embryonal carcinoma cell fate by inhibiting neuronal but not epithelial differentiation. *Journal of Cell Biology*, 116(4):1019–1033.
- [Schröder and Harder, 2006] Schröder, J. M. and Harder, J. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(4):469–486. Number: 4.
- [Semkova et al., 2015] Semkova, K., Gergovska, M., Kazandjieva, J., and Tsankov, N. (2015). Hyperhidrosis, bromhidrosis, and chromhidrosis: Fold (intertriginous) dermatoses. *Clinics in Dermatology*, 33(4):483–491. Number: 4.
- [Servetnyk and Roomans, 2007] Servetnyk, Z. and Roomans, G. (2007). Chloride transport in NCL-SG3 sweat gland cells: Channels involved. *Experimental and Molecular Pathology*, 83(1):47–53. Number: 1.
- [Sheng et al., 2009] Sheng, Z., Fu, X., Cai, S., Lei, Y., Sun, T., Bai, X., and Chen, M. (2009). Regeneration of functional sweat gland-like structures by transplanted differentiated bone marrow mesenchymal stem cells. *Wound Repair and Regeneration*, 17(3):427–435.
- [Shibasaki and Crandall, 2001] Shibasaki, M. and Crandall, C. G. (2001). Effect of local acetylcholinesterase inhibition on sweat rate in humans. *Journal of Applied Physiology*, 90(3):757–762. Number: 3.
- [Shibasaki and Crandall, 2010] Shibasaki, M. and Crandall, C. G. (2010). Mechanisms and controllers of eccrine sweating in humans. *Frontiers in Bioscience*, S2(2):685–696.
- [Shibasaki et al., 2001] Shibasaki, M., Kondo, N., and Crandall, C. G. (2001). Evidence for metaboreceptor stimulation of sweating in normothermic and heat-stressed humans. *The Journal of Physiology*, 534(2):605–611.
- [Shiohara et al., 2018] Shiohara, T., Mizukawa, Y., Shimoda-Komatsu, Y., and Aoyama, Y. (2018). Sweat is a most efficient natural moisturizer providing protective immunity at points of allergen entry. *Allergology International*, 67(4):442–447. Number: 4.

- [Simon et al., 1999] Simon, G. E., VonKorff, M., Piccinelli, M., Fullerton, C., and Ormel, J. (1999). An International Study of the Relation between Somatic Symptoms and Depression. *New England Journal of Medicine*, 341(18):1329–1335.
- [Simões et al., 2014] Simões, B., Conceição, N., Kelsh, R. N., and Cancela, M. L. (2014). Identification of *cis* -regulatory elements in the upstream regions of zebrafish *runx3* through *in silico* analysis: implications for function. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4):661–670.
- [Sohn, 2015] Sohn, E. (2015). Dogged pursuit. *Scientific American*, 312(1):S18–19.
- [Song et al., 2002] Song, Y., Sonawane, N., and Verkman, A. S. (2002). Localization of aquaporin-5 in sweat glands and functional analysis using knockout mice. *The Journal of Physiology*, 541(2):561–568. Number: 2.
- [Sonner et al., 2015] Sonner, Z., Wilder, E., Heikenfeld, J., Kasting, G., Beyette, F., Swaile, D., Sherman, F., Joyce, J., Hagen, J., Kelley-Loughnane, N., and Naik, R. (2015). The microfluidics of the eccrine sweat gland, including biomarker partitioning, transport, and biosensing implications. *Biomicrofluidics*, 9(3):031301. Number: 3.
- [Su et al., 2013] Su, G., Zhao, Y., Wei, J., Han, J., Chen, L., Xiao, Z., Chen, B., and Dai, J. (2013). The effect of forced growth of cells into 3D spheres using low attachment surfaces on the acquisition of stemness properties. *Biomaterials*, 34(13):3215–3222.
- [Svec et al., 2015] Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., and Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3:9–16.
- [Takemura et al., 1989] Takemura, T., Wertz, P., and Sato, K. (1989). Free fatty acids and sterols in human eccrine sweat. *British Journal of Dermatology*, 120(1):43–47. Number: 1.
- [Taylor and Machado-Moreira, 2013] Taylor, N. A. and Machado-Moreira, C. A. (2013). Regional variations in transepidermal water loss, eccrine sweat gland density, sweat secretion rates and electrolyte composition in resting and exercising humans. *Extreme Physiology & Medicine*, 2(1). Number: 1.
- [Thellin et al., 1999] Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75(2):291–295.

- [Trepe, 2017] Trepe, M. (2017). *Neuroanatomie - Struktur und Funktion*. Elsevier, 7 edition.
- [Van Beaumont and Bullard, 1963] Van Beaumont, W. and Bullard, R. W. (1963). Sweating: its rapid response to muscular work. *Science (New York, N.Y.)*, 141(3581):643–646. Number: 3581.
- [Van Beaumont and Bullard, 1966] Van Beaumont, W. and Bullard, R. W. (1966). Sweating exercise stimulation during circulatory arrest. *Science (New York, N.Y.)*, 152(3728):1521–1523. Number: 3728.
- [Vetter and Lewis, 2010] Vetter, I. and Lewis, R. J. (2010). Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 79(6):908–920.
- [Wallace and Reichelt, 2013] Wallace, L. and Reichelt, J. (2013). Using 3D Culture to Investigate the Role of Mechanical Signaling in Keratinocyte Stem Cells. In Turksen, K., editor, *Skin Stem Cells*, volume 989, pages 153–164. Humana Press, Totowa, NJ.
- [Wang et al., 2020] Wang, Y., Wang, R., Yao, B., Hu, T., Li, Z., Liu, Y., Cui, X., Cheng, L., Song, W., Huang, S., and Fu, X. (2020). TNF- $\alpha$  suppresses sweat gland differentiation of MSCs by reducing FTO-mediated m6A-demethylation of Nanog mRNA. *Science China Life Sciences*, 63(1):80–91.
- [Waxman and Zamponi, 2014] Waxman, S. G. and Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience*, 17(2):153–163. Number: 2.
- [Weaver et al., 1997] Weaver, V., Petersen, O., Wang, F., Larabell, C., Briand, P., Damsky, C., and Bissell, M. (1997). Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and In Vivo by Integrin Blocking Antibodies. *The Journal of Cell Biology*, 137(1):231–245. Number: 1.
- [Weng et al., 2020] Weng, T., Wu, P., Zhang, W., Zheng, Y., Li, Q., Jin, R., Chen, H., You, C., Guo, S., Han, C., and Wang, X. (2020). Regeneration of skin appendages and nerves: current status and further challenges. *Journal of Translational Medicine*, 18(1).
- [Wilke et al., 2007] Wilke, K., Martin, A., Terstegen, L., and Biel, S. S. (2007). A short history of sweat gland biology. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(3):169–179. Number: 3.

- [Willis, 2007] Willis, W. D. (2007). The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain Research Reviews*, 55(2):297–313. Number: 2.
- [Wilson et al., 2011] Wilson, J. R., Clark, R. B., Banderali, U., and Giles, W. R. (2011). Measurement of the membrane potential in small cells using patch clamp methods. *Channels (Austin, Tex.)*, 5(6):530–537.
- [Wilson et al., 1994] Wilson, S., Whiteford, M., Bovell, D., Pediani, J., Ko, W., Smith, G., Lee, C., and Elder, H. (1994). The regulation of membrane 125I- and 86Rb+ permeability in a virally transformed cell line (NCL-SG3) derived from the human sweat gland epithelium. *Experimental Physiology*, 79(3):445–459. Number: 3.
- [Wilson and Metzler-Wilson, 2015] Wilson, T. E. and Metzler-Wilson, K. (2015). Sweating chloride bullets: understanding the role of calcium in eccrine sweat glands and possible implications for hyperhidrosis. *Experimental Dermatology*, 24(3):177–178.
- [Wood et al., 1990] Wood, J. N., Bevan, S. J., Coote, P. R., Dunn, P. M., Harmar, A., Hogan, P., Latchman, D. S., Morrison, C., Rougon, G., and Theveniau, M. (1990). Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proceedings. Biological Sciences*, 241(1302):187–194.
- [Woods et al., 2007] Woods, A., Wang, G., Dupuis, H., Shao, Z., and Beier, F. (2007). Rac1 Signaling Stimulates N-cadherin Expression, Mesenchymal Condensation, and Chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32):23500–23508.
- [Xie et al., 2012] Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., and Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1):75–84.
- [Xie et al., 2013] Xie, W., Strong, J. A., Ye, L., Mao, J.-X., and Zhang, J.-M. (2013). Knockdown of sodium channel NaV1.6 blocks mechanical pain and abnormal bursting activity of afferent neurons in inflamed sensory ganglia. *Pain*, 154(8):1170–1180. Number: 8.
- [Xu et al., 2010] Xu, W., Wu, Y., Bi, Y., Tan, L., Gan, Y., and Wang, K. (2010). Activation of Voltage-Gated KCNQ/Kv7 Channels by Anticonvulsant Retigabine Attenuates Mechanical Allodynia of Inflammatory Temporomandibular Joint in Rats. *Molecular Pain*, 6:1744–8069–6–49.
- [Yamamizu and Yamashita, 2011] Yamamizu, K. and Yamashita, J. K. (2011). Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and

- arterial-venous specification during vascular development. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 75(2):253–260.
- [Yamamoto et al., 1993] Yamamoto, M., Sobue, G., Li, M., Arakawa, Y., Mitsuma, T., and Kimata, K. (1993). Nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) mRNA levels in cultured rat Schwann cells; differential time- and dose-dependent regulation by cAMP. *Neuroscience Letters*, 152(1-2):37–40.
- [Yamashita et al., 1987] Yamashita, Y., Ogawa, T., Ohnishi, N., Imamura, R., and Sugeno, J. (1987). Local effect of vasoactive intestinal polypeptide on human sweat-gland function. *The Japanese Journal of Physiology*, 37(5):929–936. Number: 5.
- [Yao et al., 2019] Yao, B., Xie, J., Liu, N., Hu, T., Song, W., Huang, S., and Fu, X. (2019). Direct reprogramming of epidermal cells toward sweat gland-like cells by defined factors. *Cell Death & Disease*, 10(4). Number: 4.
- [Yin et al., 2016] Yin, K., Baillie, G. J., and Vetter, I. (2016). Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Molecular Pain*, 12:174480691664611.
- [Zhang et al., 2017] Zhang, X., Priest, B. T., Belfer, I., and Gold, M. S. (2017). Voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in human dorsal root ganglion neurons. *eLife*, 6:e23235.
- [Zhao et al., 2015] Zhao, Z., Xu, M., Wu, M., Ma, K., Sun, M., Tian, X., Zhang, C., and Fu, X. (2015). Direct reprogramming of human fibroblasts into sweat gland-like cells. *Cell Cycle*, 14(21):3498–3505.
- [Zheng et al., 2007] Zheng, J.-H., Walters, E. T., and Song, X.-J. (2007). Dissociation of Dorsal Root Ganglion Neurons Induces Hyperexcitability That Is Maintained by Increased Responsiveness to cAMP and cGMP. *Journal of Neurophysiology*, 97(1):15–25.
- [Zheng et al., 2013] Zheng, Q., Fang, D., Liu, M., Cai, J., Wan, Y., Han, J.-S., and Xing, G.-G. (2013). Suppression of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in dorsal root ganglion neurons contributes to the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain*, 154(3):434–448. Number: 3.
- [Zurina et al., 2018] Zurina, I. M., Shpichka, A. I., Saburina, I. N., Kosheleva, N. V., Gorkun, A. A., Grebenik, E. A., Kuznetsova, D. S., Zhang, D., Rochev, Y. A., Butnaru,

D. V., Zharikova, T. M., Istranova, E. V., Zhang, Y., Istranov, L. P., and Timashev, P. S. (2018). 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings *in vitro*. *Biomedical Materials*, 13(5):054104.

# A. Anhang

## A.1. Abkürzungsverzeichnis

2D / 3D	zwei- / dreidimensional
ahTTX	Anhydrotetrodotoxin
ANO1	Anoctamin 1, auch TMEM16A genannt
ANOVA	Analysis Of Variance
AP	Aktionspotential
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca <sub>v</sub>	Ca <sup>2+</sup> -Kanal, <i>voltage gated</i>
CaCC	Ca <sup>2+</sup> -abhängigen Chloridkanälen
Ca <sub>v</sub> 1h	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H</i>
cAMP	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i>
Canx	Calnexin
Capn10	Calpain 10
cDNA	<i>copy DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHRM3	Acetylcholinrezeptor, muskarinerg 3
C <sub>q</sub>	<i>quantification cycle</i>
CRAC	<i>calcium release activated calcium channel</i>
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol

db-cAMP	Dibutyryl-cAMP
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DRG	<i>dorsal root ganglia</i>
EC	Extrazellulärpuffer
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	endoplasmatischen Retikulum
ESC	Epidermale Stammzelle
FDA	Fluorescin-Diacetat
FKS	Fötales Kälberserum
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	<i>gene of interest</i>
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
hSGSC	<i>human sweat gland derived stem cell</i>
IC	Intrazellulärpuffer
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
iPS	induzierte Pluripotente Stammzellen
ITPR2	Inositoltriphosphatrezeptor 2
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
K <sub>v</sub>	K <sup>+</sup> -Kanal, <i>voltage gated</i>
Kcnd3	<i>potassium voltage-gated channel subfamily D member 3</i>
Kcnk3	<i>potassium two pore domain channel subfamily K member 3</i>
Kcnq2	<i>potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2</i>

KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
Mapk2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 2
MCH	Methyl-Acetylcholin, auch <i>Mecholyl</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
Na <sub>v</sub>	Na <sup>+</sup> -Kanal, <i>voltage gated</i>
Nefm	Neurofilament
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid, <i>nitric oxide</i>
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
Ntrk3	Neurotrophe Tyrosinkinase Rezeptor Typ 3
OCT4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
OD	optische Dichte
ORAI1	<i>calcium release-activated calcium modulator 1</i>
Pbib	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase B
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI	Propidiumiodid
PIP <sub>2</sub>	Phospholipidphosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PNS	Peripheres Nervensystem
Prph	Peripherin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPL13a	60S Ribosomales Protein L13a
RT-qPCR	Reverse Transkription – quantitative <i>real-time</i> -PCR

Runx3	<i>Runt related transcription factor 3</i>
SCN8A	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 8</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SOCE	<i>store operated calcium entry</i>
SOX2	SRY (Sex determining Region Y)-Box 2
STIM	<i>stromal interaction molecule</i>
Syn1	Synapsin 1
Syp	Synaptophysin
Syt1	Synaptotagmin 1
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)-Phosphin
TE	Tris Ethylenediamintetraessigsäure
TEA	Tetraethylammonium
TMEM	<i>trans membrane protein</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TTX	Tetrodotoxin
Tubb3	Tubulin beta 3
ZNS	zentrales Nervensystem

## A.2. Abbildungsverzeichnis

2.1. Methoden zur Generierung von multizellulären Sphäroiden. . . . .	11
2.2. Publikationen im Bereich der 3D-Zellkultur. . . . .	12
2.3. Aufbau der Nerven. . . . .	14
2.4. Wichtige Ionenkanäle der primären Nozizeption. . . . .	17
2.5. Aufbau der ekkrinen Schweißdrüse . . . . .	24
3.1. Produktion der Mikromulden . . . . .	41
3.2. Untersuchung der Expressionsstabilität . . . . .	46
4.1. F11-Zellen in 2D-Kultur . . . . .	50

---

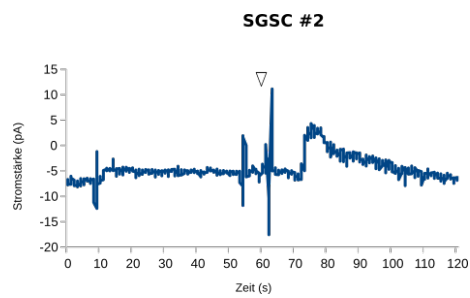
4.2. F11-Zellen in 3D-Kultur . . . . .	51
4.3. Vitalitätsfärbung von F11-Sphäroiden . . . . .	52
4.4. Expression peripherer neuronaler Marker in F11-Zellen . . . . .	53
4.5. Patch-Clamping an F11-Einzelzellen . . . . .	56
4.6. Lichtmikroskopische Aufnahmen von hSGSCs in der 2D-Kultur . . . . .	58
4.7. Relative Genexpression der hSGSC-Linien . . . . .	59
4.8. Morphologie der hSGSC 3D-Kultur . . . . .	60
4.9. Vitalitätsfärbung der hSGSC-Sphäroide . . . . .	61
4.10. Vergleich der relativen Genexpression zwischen 2D- und 3D-Kultur in hS- GSCs . . . . .	62
4.11. Patch-Clamping an hSGSC-Zellen der 2D-Kultur . . . . .	64
4.12. Beispielhafte Aufnahmen des Calcium-Imagings in hSGSCs . . . . .	65
4.13. Veränderung der Calcium-Konzentration durch MCH-Stimulation in hS- GSCs . . . . .	66
A.1. Effekt der MCH-Applikation auf den Membranstrom einer hSGSC-Zelle .	112

### A.3. Tabellenverzeichnis

2.1. Subtypen von sensorischen Nervenfasern. . . . .	15
3.3. Verwendete Primer für F11-Zellen . . . . .	34
3.4. Verwendete Primer für hSGSCs . . . . .	36
3.8. Temperaturzyklen der PCR-Reaktion . . . . .	45
3.9. Patch-Clamping Pulsprotokolle . . . . .	48
A.2. qPCR-Primer für F11-Zellen. . . . .	111

**Tabelle A.2.: Primer für F11-Zellen.** l - Länge der PCR-Produkte in Basenpaaren, i.s. - intronspannendes PCR-Produkt (j - ja, n - nein), Kit - verwendeter PCR-Mix, c - eingesetzte Primerkonzentration, E - Amplifikationseffizienz [%]. Für die Gene *Tubb3*, *Kcnd3* und *Ntrk3* wurden Primerpaare der Firma Qiagen verwendet. Die Sequenzen für diese Primer ist nicht bekannt, statt dessen wurde die Produkt-ID angegeben.

Genname/-ID	Spezifität	Sequenz (5' → 3')	l [bp]	i.s.	Kit	c [µM]	E
<i>Cacna1h</i> / 58226	Maus & Ratte	forward reverse TCGTTGGACAGATAGCGGG	142	n	SensiFast	1,25	99,9
<i>Canx</i> / 12330	Maus	forward reverse CGTCCATATCCTCATCCCAATCC	77	j	QuantiFast	1,25	102,0
<i>Capn10</i> / 23830	Maus & Ratte	forward reverse ACGGCACTGAGGGAGATTTTC	132	j	QuantiFast	1,25	108,0
<i>Gapdh</i> / 14433	Maus & Ratte	forward reverse GCGGTCAACAAGTTCTCCGTG	89	n	SensiFast	1,25	111,4
<i>Hcn2</i> / 15166	Maus & Ratte	forward reverse CCATGAACAACAGCATGTGTAAG	148	n	SensiFast	2,5	104,5
<i>Kcnk3</i> / 16527	Maus & Ratte	forward reverse CAAGGTGTTTCGCATGTTCTAC	180	n	SensiFast	2,5	108,3
<i>Kcnq2</i> / 16536	Maus & Ratte	forward reverse AGAAGGTCAAGTTTGAAGATGGTG	122	n	QuantiFast	1,25	99,9
<i>Nefm</i> / 18040	Maus & Ratte	forward reverse ATTGTGTTGGACCTTGAGCTTG	123	n	SensiFast	1,25	111,7
<i>Ppib</i> / 19035	Maus	forward reverse GCACACTTCATATTGGCTCC	87	n	SensiFast	2,5	104,0
<i>Prph</i> / 19132	Maus & Ratte	forward reverse GCCAAGCTTAGGAATAGGCTG	85	n	SensiFast	2,5	102,2
<i>Rpl13a</i> / 317646	Maus & Ratte	forward reverse GGATGGTGGTCCCTGGCTG	111	n	SensiFast	2,5	103,3
<i>Scn8a</i> / 20273	Maus & Ratte	forward reverse GCCTGAAGACAATCGTGGGG	156	n	QuantiFast	1,25	106,5
<i>Syn1</i> / 20964	Maus & Ratte	forward reverse GCATGGCACGTAATGGAGAC	143	n	SensiFast	1,25	95,4
<i>Syp</i> / 20977	Maus & Ratte	forward reverse CAAAGCGGAAGATGGCAAAGAC	110	n	SensiFast	1,25	114,0
<i>Syr1</i> / 20979	Maus & Ratte	forward reverse TCACCACTGTTGGCACCC	105	n	SensiFast	2,5	106,9
<i>Tubb3</i> / 22152	Maus & Ratte	Paar Mm_Tubb3_1_SG (Qiagen, QT00124733)	107	j	SensiFast	1x	102,2
<i>Kcnd3</i> / 56543	Maus & Ratte	Paar Mm_Kcnd3_vb.1_SG (Qiagen, QT01160999)	97	n	QuantiFast	1x	98,7
<i>Ntrk3</i> / 18213	Maus & Ratte	Paar Mm_Ntrk3_1_SG (Qiagen, QT00146153)	135	j	SensiFast	1x	99,2



**Abbildung A.1.: Effekt der MCH-Applikation auf den Membranstrom einer hSGSC.** Die Kurve zeigt die einzige erfolgreiche stabile Messung über einen Zeitraum von mehreren Minuten einer hSGSC #2. Die Zelle wurde im Current-Clamp-Modus bei -70 mV gehalten, nach 60 s wurden 5  $\mu$ M MCH appliziert (Pfeilspitze). Die Applikation führte zu einem leichten, kurzzeitigen Anstieg der Stromstärke.

#### **A.4. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.



Zweibrücken, den 21.12.2023

## A.5. Danksagung

Ganz herzlich danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Charli Kruse für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der damaligen Fraunhofer EMB anzufertigen. Ich schätze die respektvolle und produktive Arbeitsatmosphäre, die er durch seine Leitung geschaffen hat.

Meinem fachlichen Betreuer Dr. Matthias Brandenburger danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit, die wissenschaftliche Freiheit und die Anregungen bei der Planung und Auswertung der Experimente und dem Verfassen der vorliegenden Arbeit.

Ich danke den vielen Kolleg:innen in der EMB, die mir mit Rat und Tat und Freundlichkeit zur Seite standen, insbesondere Anna, Janina, Heiko, Dennis, Emel, Kerstin, Imke, Sebastian, Marina, Daniel, Sebastian und Nazmi.

Außerdem möchte ich allen Menschen in meinem Umfeld danken, die mir immer wieder Mut gemacht haben und mir geholfen haben, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren, allen voran meinen Eltern.

Und natürlich danke ich Shmeaux v. I. für seine Existenz und seine Freundschaft.

*“Unbehagen beruht oft auf unseren Erwartungen. Wenn man akzeptiert, dass Regen bedeutet, kalt und nass zu werden, lässt er sich wesentlich leichter ertragen.”* (Frei übersetzt nach Robin Hobb – The Fools Errand).

Und zuletzt, liebste Anne, danke ich dir, dass du mit mir diesen langen Regen ertragen hast und den Weg mit mir bis zum Ende gegangen bist.