

Aus der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Isolierung, Kultivierung und
magnetische Separation
von Vorläuferzellen aus
humanem respiratorischem Epithel**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Marek Wentges
aus Bonn

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. PD Dr. Michael Sittinger, Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie, Interdisziplinäres Labor für Tissue Engineering
2. Prof. Dr. Oliver Kaschke, St. Gertrauden-Krankenhaus Berlin,
Abteilung für HNO-Heilkunde, Plastische Gesichts- und Hals-Chirurgie
3. Prof. Dr. Dr. Rainer Schmelzeisen, Universitätsklinikum Freiburg,
Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Datum der Einreichung: 31.10.2003

Datum der Promotion: 13.12.2004

Kurzfassung:

EINLEITUNG: Eine Trachealrekonstruktion bedingt Komplikationen wie z. B. Infektionen und Stenosingen durch Granulationsgewebe. Diese werden durch ein differenziertes respiratorisches Epithel, das eine mukoziliäre Clearance ermöglicht, deutlich reduziert. Die Basalzellen gelten als die Vorläuferzellen des humanen respiratorischen Epithels (HRE), d. h. sie können sich teilen und besitzen das Potenzial zur Differenzierung. Durch die magnetische Zellseparation (MACS) sollen Vorläuferzellen aus dem HRE angereichert und anschließend kultiviert werden.

METHODEN: Die Conchae nasales inferiores von 80 Patienten (mittleres Alter 40 ± 14 Jahre) dienen als Zellquelle für HRE-Zellen, die mittels enzymatischen Verdauung mit Dispase II (2,4 U/ml) aus dem Gewebeverband isoliert werden. Die Kultivierung der HRE-Zellen erfolgt auf Kollagen-A-beschichteten Kulturgefäßen in serumfreiem AECG-Medium. Die Bindungsspezifität von verschiedenen extrazellulären Zellmarkern wie GSA I B4, CD44S und CD44v6 wird immunhistochemisch überprüft. Dabei erweist sich nur CD44v6 als spezifisch für Basalzellen. Die Vorläuferzellen aus dem HRE-Zellgemisch werden durch monoklonale Antikörper gegen CD44v6 und Goat-Anti-Mouse-Microbeads magnetisch konjugiert. Anschließend werden sie mittels MACS positiv selektiert.

ERGEBNISSE: Die Präparation der Nasenmuscheln ergibt Einzelzellsuspensionen aus vitalen HRE-Zellen (Vitalität $> 80\%$, $n = 30$). Eine Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen A steigert die Adhärenz der HRE-Zellen signifikant ($p \leq 0,0145$, $n = 5$). Die Proliferationskinetik der HRE-Zellkulturen lässt sich durch die Populationsverdoppelungszeit charakterisieren ($t_{PD} = 23 \pm 3h$, $n = 3$). Während eines Monats wird die Proliferationskapazität der HRE-Zellen durch Zellvermehrung (383fach, $n = 6$) ermittelt. Die magnetische Separation ergibt eine Zellfraktion ($20 \pm 2\%$, $n = 5$), die sich positiv zu CD44v6 verhält. Anschließend werden die separierten Zellen eine Woche auf Kollagen A kultiviert, wobei sie alle ein adäquates Proliferationsverhalten aufweisen.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Ergebnisse zeigen, dass CD44v6 ein spezifischer Marker für Basalzellen ist, der sich für die Anreicherung einer positiven Zellfraktion mittels MACS eignet. In weiteren Studien muss überprüft werden, inwiefern eine solche magnetisch separierte Population aus Basalzellen die Besiedelung eines Trachealersatzes mit einem differenzierten respiratorischen Epithel ermöglicht.

Abstract:

OBJECTIVE: Common problems affecting patients with tracheal replacement are infections and stenosis caused by granulation tissue. These complications can be minimized by establishing a differentiated respiratory epithelium, which facilitates mucocilliary clearance. The basal cells are regarded as the progenitor cells of the human respiratory epithelium (HRE). They are known to divide and possess the ability to differentiate. These cells can be enriched by means of magnetic cell sorting (MACS) for the purpose of cultivation.

METHODS: The inferior nasal turbinates of 80 patients (mean age 40 ± 14 years) are used as cell source. The HRE-cells are isolated by a standard preparation using an enzymatic digestion with Dispase II (2,4 U/ml). The HRE-cells are plated on culture dishes coated with Collagen A in serum-free AECG-Medium. Several extracellular cell markers including GSA I B4, CD44S and CD44v6 are tested by immunohistochemistry. Only CD44v6 shows specific staining of basal cells. The progenitor cells of mixed single cell suspensions of HRE-cells are marked with monoclonal antibodies against CD44v6 and are conjugated with Goat-Anti-Mouse-Microbeads. Enrichment of progenitor cells is achieved by MACS using a positive selection protocol.

RESULTS: The preparation of the nasal turbinates yields viable single cell suspensions of HRE-cells (viability $> 80\%$, $n = 30$). Adhesion of HRE-cells is enhanced significantly ($p \leq 0,0145$, $n = 5$) by coating the culture dishes with Collagen A. The kinetics of proliferation of HRE-cell-cultures can be characterized by the population doubling time ($t_{PD} = 23 \pm 3h$, $n = 3$). In the course of one month the capacity of proliferation is approximated by cell expansion (383fold, $n = 6$). Magnetic cell sorting results in a cell fraction ($20 \pm 2\%$, $n = 5$) positive for CD44v6. The separated cells are cultured on Collagen A for one week, where they all show adequate proliferation.

CONCLUSIONS: The results indicate that CD44v6 is a specific marker for basal cells and enables the enrichment of a positive cell fraction via application of MACS. Further studies will be required to investigate the potential of such a magnetically separated population of basal cells to generate a differentiated respiratory epithelium on a tracheal prosthesis.

Schlagworte:

Gewebezüchtung

Luftröhre

Vorläuferzelle

Basalzelle

CD44

MACS

Keywords:

tissue engineering

trachea

progenitor cell

basal cell

CD44

MACS

„Wissenschaft wird immer eine Suche sein, niemals wirklich eine Entdeckung.
Es ist eine Reise, niemals wirklich eine Ankunft.“

Karl R. Popper (1902 – 1994)

Abkürzungsverzeichnis:

AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AECGM	Airway-Epithelial-Cell-Growth-Medium
AK	Antikörper
ALI	Air-Liquid-Interface
BSA	Bovines-Serum-Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CK	Cytokeratin
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting
FBS	Fetal-Bovine-Serum
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
GSA I B4	Griffonia-Simplicifolia-Agglutinin Typ I B4
HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HRE-Zellen	Humane-Respiratorische-Epithel-Zellen
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
MACS	Magnetic-Cell-Sorting
P0, P1, P2 usw.	Passagen-Anzahl
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidium-Iodid
PNA	Peanut-Agglutinin
t_{PD}	Populations-Verdoppelungs-Zeit
UEA I	Ulex-Europaeus-Agglutinin Typ I

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung:	3
Abstract:	4
Abkürzungsverzeichnis:	7
1 Einleitung	11
1.1 Aufbau und Rekonstruktion der Trachea	11
1.2 Respiratorisches Epithel	14
1.3 Conchae nasales	15
1.4 Tissue Engineering	16
1.5 Zellmarker zur Gewebecharakterisierung	18
1.6 Verfahren der Zellseparation	19
1.6.1 Parallele Zelltrennverfahren	20
1.6.2 Serielle Zelltrennverfahren	22
1.7 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Chemikalien	25
2.1.2 Geräte	26
2.1.3 Zellkultur	27
2.1.4 Histologie	28
2.1.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	29
2.2 Methoden	29
2.2.1 Isolierung und Kultivierung	29
2.2.2 Adhärenzverhalten	31
2.2.3 Populationsverdoppelungszeit	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.4	Expansionsstudie	32
2.2.5	Differenzierung im Air-Liquid-Interface	32
2.2.6	Magnetische Separation von Vorläuferzellen	33
2.2.7	Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	39
2.2.8	Statistik.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Isolierung und Kultivierung	42
3.1.1	Adhärenzverhalten	44
3.1.2	Populationsverdoppelungszeit.....	45
3.1.3	Expansionsstudie	47
3.2	Zellmarkerspezifitäten	49
3.3	Magnetische Separation von Vorläuferzellen	53
4	Diskussion	58
4.1	Isolierung und Kultivierung	58
4.1.1	Adhärenzverhalten	59
4.1.2	Proliferationsverhalten.....	60
4.1.3	Differenzierung im Air-Liquid-Interface	61
4.2	Zellmarker für das humane respiratorische Epithel	62
4.2.1	Alcianblau-Färbung	63
4.2.2	Lektine.....	64
4.2.3	Monoklonale Antikörper.....	65
4.3	Magnetische Separation von Vorläuferzellen	66
4.4	Ausblick.....	70
5	Zusammenfassung.....	72

Inhaltsverzeichnis

Literaturverzeichnis:	75
Eidesstattliche Erklärung:	85
Curriculum Vitae:	86
Danksagung:	87

1 Einleitung

In der klinischen Medizin besteht die Notwendigkeit, Organe bei Versagen oder bei Verlust durch Prothesen oder Transplantate zu ersetzen. Neben ganzen Organen, wie z. B. Herz, Niere, Leber und Lunge, werden auch Gewebe, wie Knochen, Knorpel, Muskel und Haut, transplantiert [1]. Eine mögliche Komplikation bei der Organ- und Gewebetransplantation stellt die Immunreaktion des Empfängers gegen das körperfremde Transplantat dar. Die Immunreaktion kann zu einer Transplantatabstoßung führen und erfordert deswegen eine lebenslange Immunsuppression [1]. Patienten, die ein neues Organ benötigen, werden zudem mit der Situation konfrontiert, dass ein Mangel an Spenderorganen herrscht, was im Einzelfall zu unbefristeten Wartezeiten führt [2].

Neue Perspektiven ergeben sich durch den Einsatz von Tissue Engineering, denn durch die Entnahme von geringen Mengen an körpereigenem Gewebe kann durch Vermehrung und Differenzierung autologes Ersatzgewebe zur Verfügung gestellt werden [1]. Ein Anwendungsgebiet von Tissue Engineering in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie ist die Deckung von strukturellen Defekten im Kopf-Hals-Bereich mit Ersatzmaterialien wie Knochen und Knorpel [3]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Grundlagen für den Ersatz einer Luftröhre.

1.1 Aufbau und Rekonstruktion der Trachea

Die Trachea ist eine luftleitende Röhre und gehört zum konduktiven Teil des Respirationstraktes. Hierbei erfüllt die Trachea drei essentielle Funktionen: Anwärmen, Anfeuchten und Reinigen der Atemluft. Die Trachea (**Abb. 1**) lässt sich mit einem elastischen Rohr vergleichen. Sie erstreckt sich vom Larynx bis zur Aufteilung an der Carina in die beiden Hauptbronchien über eine Länge von 9 bis 14 cm [4]. Topographisch liegt die Trachea ventral vom Ösophagus und mündet in das obere Mediastinum. Die 16 bis 20 hufeisenförmigen Spangen aus hyalinem Knorpel in Kombination mit der dorsalen Paries membranaceus stabilisieren das Lumen der Trachea und erlauben gleichzeitig ein Höchstmaß an Flexibilität [4]. Das Lumen der Trachea wird von dem respiratorischen Flimmerepithel ausgekleidet [5].

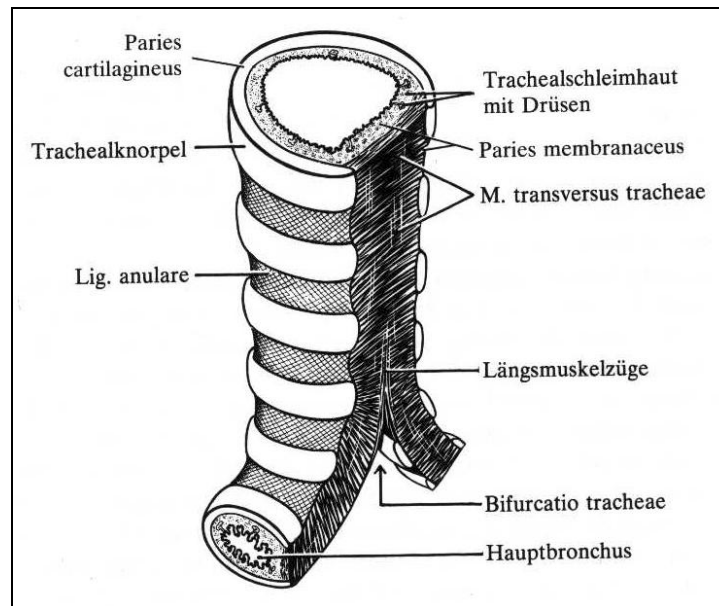


Abb. 1: Darstellung der Trachea in dorsolateraler Ansicht. Die Trachea besteht aus 16 bis 20 Knorpelspannen und einer elastisch-muskulösen Membran auf der Rückseite. Das Innere der Röhre wird von der Schleimhaut der Atemwege ausgekleidet [4].

Die primäre Funktion der Trachea besteht in der Ventilation der Lungen. Defekte der Trachea können traumatischer, infektiöser oder tumoröser Genese sein und die Ventilation erheblich einschränken. Die weiträumige Resektion von Tumoren im thorakalen sowie im Kopf-Hals-Bereich und die Behebung von langstreckigen Trachealstenosen können eine Rekonstruktion der Trachea erfordern, weil nur so ein genügend weites Lumen für die Passage der Atemluft aufrechterhalten werden kann [6].

Symptome der Trachealstenose [6]:

- Dyspnoe
- verminderte $FIV_1 < 1l$ (forcierte inspiratorische Ein-Sekunden-Kapazität)
- inspiratorischer Stridor
- Heiserkeit
- Zyanose

In annähernd 80% der Fälle entsteht eine Trachealstenose aufgrund von Langzeitintubation oder durch inadäquat ausgeführte Tracheotomie [7]. Vor allem bei Kindern

werden kongenitale Stenosen und die Laryngotracheomalazie beobachtet, ein Zustand mit Erweichung der knorpeligen Anteile der Luftröhre [8]. Inhalative Traumen und Verätzungen betreffen insbesondere das respiratorische Epithel und können zu narbigen Strikturen führen. Tumoren sind eine weitere Ursache für Stenosierung der Trachea. Eine Vergrößerung der Schilddrüse durch eine Struma oder ein Karzinom kann das Lumen der Trachea von außen komprimieren [6]. Das Ösophaguskarzinom und mediastinale Tumoren wie das Lymphom sind weitere Tumoren, die in topographischer Nachbarschaft zur Trachea stehen und eine partielle Resektion der Trachea erfordern können. Larynxkarzinome und Bronchialkarzinome können sekundär in das Lumen der Trachea einwachsen [6]. Primäre intratracheale Tumoren treten hingegen selten auf: Das Papillom ist mit dem humanen Papillomavirus Typ 6 und 11 assoziiert und zeigt eine Neigung zu Rezidiven; das Adenoid-Zystische-Karzinoid gehört zu den malignen Tumoren und geht ursprünglich vom Drüsengewebe aus [6].

Stenosen der Trachea schränken die Lebensqualität stark ein und können bei starker Ausprägung vital gefährdend sein [9]. In der Therapie von Trachealstenosen liefert die Resektion kurzer stenotischer Bereiche von bis zu 4 cm mit anschließender End-zu-End-Anastomose eine 90%ige Erfolgsquote [6]. Maximal kann eine Resektion aber nur bis zur halben Länge der Trachea, etwa 6 cm, sicher durchgeführt werden [9]. Extensive Trachealstenosen können durch eine Tracheal-Erweiterungs-Plastik nach der Methode von Rethi gelindert werden [10]. Dabei wird die Engstelle longitudinal gespalten und durch Einsetzen von autologem Rippenknorpel geweitet. Bei tumorösen Trachealstenosen kann zur palliativen Behandlung das Lumen der Trachea durch den Einsatz von Silikon-Stents stabilisiert werden [11]. Die häufigsten Komplikationen bei Tracheal-Stents sind Sekretretention mit 31% und Stentdislokation mit 17% [12].

Ein optimaler Trachealersatz muss mindestens zwei Anforderungen genügen: Er muss erstens aus einem Rohr mit lateraler Stabilität und longitudinaler Elastizität bestehen, und zweitens sollte er mit einem zilientragenden respiratorischen Epithel ausgestattet sein [9]. Bisher gibt es allerdings keine Methode, die die kurative Versorgung langstreckiger Trachealstenosen auf Dauer zufriedenstellend gewährleistet [9]. Operationsmethoden, bei denen der stenotische Trachealabschnitt durch Prothesen dauerhaft ersetzt wird, gelten bislang nicht als etabliert [9]. Zwar gelingt es, die biomechanischen Eigenschaften der Trachea durch solide oder poröse Materialien nachzuahmen, die Grundproblematik einer permanenten reizlosen Inkorporation von Trachealprothesen

scheint dennoch ungelöst. Durch mangelnde Epithelisierung der Prothese kommt es zur Bildung von Narbengewebe und zur Stenosierung [13, 14]. Weitere Probleme sind Infektionen und Nahtdehiszenz [15]. Bisher werden synthetische Prothesen wie Herzklappen, Gefäß- und orthopädische Prothesen nur in sterilen mesenchymalen Geweben erfolgreich toleriert [9]. Besonders unangenehm empfinden Patienten eine mögliche Borkenbildung und die bakterielle Besiedlung der Trachea, z. B. mit *Pseudomonas aeruginosa*, die mit fauligem Odor einhergeht [9]. Die Funktionalität eines Trachealersatzes hängt, neben der Epithelisierung, auch wesentlich von der Vaskularisierung ab. Nur eine suffiziente Vaskularisierung sorgt für die Vitalität eines großen Gewebetransplantates und beugt der Komplikation einer Nekrose vor [16, 17]. Die Epithelisierung des Trachealersatzes übernimmt eine antiinfektiöse Schutzwirkung und vermindert das Risiko der exzessiven Bildung von Granulationsgewebe [14].

1.2 Respiratorisches Epithel

Histologisch betrachtet handelt es sich bei dem respiratorischen Epithel um ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel (**Abb. 2**), bei dem alle Zellen auf der Basalmembran verankert sind, jedoch nicht jede Zelle die Oberfläche erreicht [5]. Innerhalb des respiratorischen Epithels lassen sich drei Zelltypen unterscheiden: Basalzellen, Becherzellen und Zilienzellen [18].

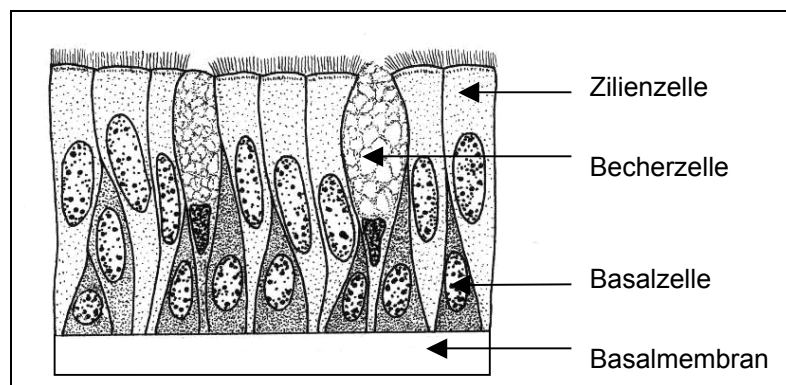


Abb. 2: Darstellung des mehrreihigen hochprismatischen Flimmerepithels mit seinen drei Zelltypen, den Zilienzellen, Becherzellen und Basalzellen sowie der Basalmembran auf der Unterseite [18].

Untersuchungen weisen darauf hin, dass bei dem respiratorischen Epithel zumindest funktionell zwei Schichten unterschieden werden können, nämlich eine Basalzellschicht und eine Schicht aus hochprismatischen Becher- und Zilienzellen [19]. Die Basalmembran wird via Hemidesmosomen zu 90% mit Basalzellen bedeckt [20]. Die hochprismatischen Becher- und Zilienzellen sind ihrerseits mittels Desmosomen auf den Basalzellen verankert [20]. Die Becherzellen und die Zilienzellen wirken zusammen bei der mukoziliären Clearance [21]. Fremdpartikel, wie z. B. Staub, werden durch das muköse Sekret der Becherzellen gebunden. Durch den direktionalen Zilienschlag der Flimmerzellen werden die gebundenen Partikel in Richtung Pharynx transportiert und können dort abgehustet oder geschluckt werden [5].

Den drei Zelltypen des humanen respiratorischen Epithels werden folgende Eigenschaften zugesprochen: Die Zilienzellen gelten als terminal differenziert und können sich nicht mehr teilen [22]. Die Becherzellen gehören zu den sekretorischen Zellen und werden allgemein als teilungsfähig angesehen [22]. Die Basalzellen gelten als Vorläuferzellen des respiratorischen Epithels und besitzen das Potential zur Proliferation und zur Differenzierung in Becher- und Zilienzellen [22, 23]. Allerdings ist es strittig, ob ausschließlich die Basalzelle als Vorläuferzelle gelten darf. Dagegen spricht die Behauptung, dass nur sekretorische Zellen ein differenziertes respiratorisches Epithel regenerieren können [24, 25]. Die zentrale Rolle der Basalzelle als Vorläuferzelle im respiratorischen Epithel wird jedoch in der einschlägigen Literatur überwiegend befürwortet [20, 26, 27]. Im nativen humanen respiratorischen Epithel sind die Basalzellen, die durch Färbung der intrazellulären Zytokeratine CK5/14 spezifisch nachgewiesen werden, mit einem Anteil von ca. 30% vertreten [28]. Die Basalzellen übernehmen bei Epithelverlust zusätzlich eine Barrierefunktion, indem sie sich abflachen und verbreitern [29].

1.3 Conchae nasales

Die Conchae nasales ragen als hakenförmige Lamellenknochen von der lateralen Wand der Cavitas nasi (**Abb. 3**) hervor. Als Bestandteil der oberen Atemwege werden die Conchae nasales von der respiratorischen Mukosa überzogen und sind schwellungsfähig. Von den drei paarig angelegten Nasenmuscheln bilden allein die Conchae nasales inferiores einen selbstständigen Knochen [4].

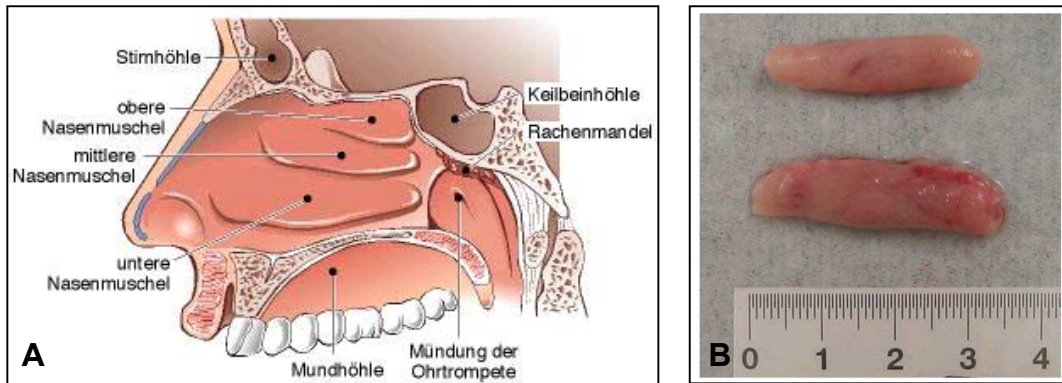


Abb. 3: Links: Sagittalschnitt durch die Nasenhöhle mit Darstellung der drei Nasenmuscheln (**A**, Quelle: Yavivo, Lifeline). Rechts: Abbildung des unteren Nasenmuschel-paares nach operativer Entnahme (**B**).

Die operative Entfernung der Nasenmuscheln (**Abb. 3**) wird als Konchotomie bezeichnet. Die Indikation dazu ist z. B. geboten bei Hyperplasie der Nasenmuscheln und bei chronischer Verlegung der Atemwege mit der möglichen Komplikation einer Sinusitis [30]. Die Conchae nasales inferiores sind mit dem respiratorischen Epithel ausgestattet und können deshalb als Zellquelle für das Tissue Engineering der Trachea verwendet werden [31].

1.4 Tissue Engineering

Der Begriff Tissue Engineering geht auf die Verwendung durch die amerikanische National Science Foundation (NSF) im Jahr 1987 zurück [32]. Heute gestaltet sich das Tissue Engineering als ein interdisziplinäres Forschungsgebiet aus den Bereichen Biotechnologie, Zellbiologie, Zellkulturtechnik, Biomaterialentwicklung und klinische Medizin [3]. Tissue Engineering wird definiert als das Vermehren von Zellen in vitro mit anschließender Redifferenzierung in ein funktionelles Gewebe. Ein interessantes Einsatzgebiet von Tissue Engineering besteht in der Herstellung von autologen Transplantaten (**Abb. 4**).

Die Verfahren zur Herstellung von autologen Transplantaten aus Knorpel, Haut und Knochen haben bereits klinische Relevanz erreicht. Knorpeldefekte können u. a. durch die Autologe-Chondrozyten-Transplantation (ACT) behandelt werden. Dazu wird in den Knorpeldefekt eine Zellsuspension aus autologen Chondrozyten eingebracht und mit

einem Periostlappen abgedeckt [33]. Neuerdings ist es möglich, Gelenkdefekte durch autologe Chondrozyten in stabilen resorbierbaren Vliesen passgenau auszubessern [34]. Die „Haut aus der Tube“ wird dazu verwendet, oberflächliche Ulcerationen der Epidermis zu verschließen [35]. Die Sinuslift-Operation bedient sich der Augmentation von atrophen Oberkieferknochen mit autologem Periost, wodurch sich die Möglichkeit für eine stabile Zahnimplantation bietet [36].

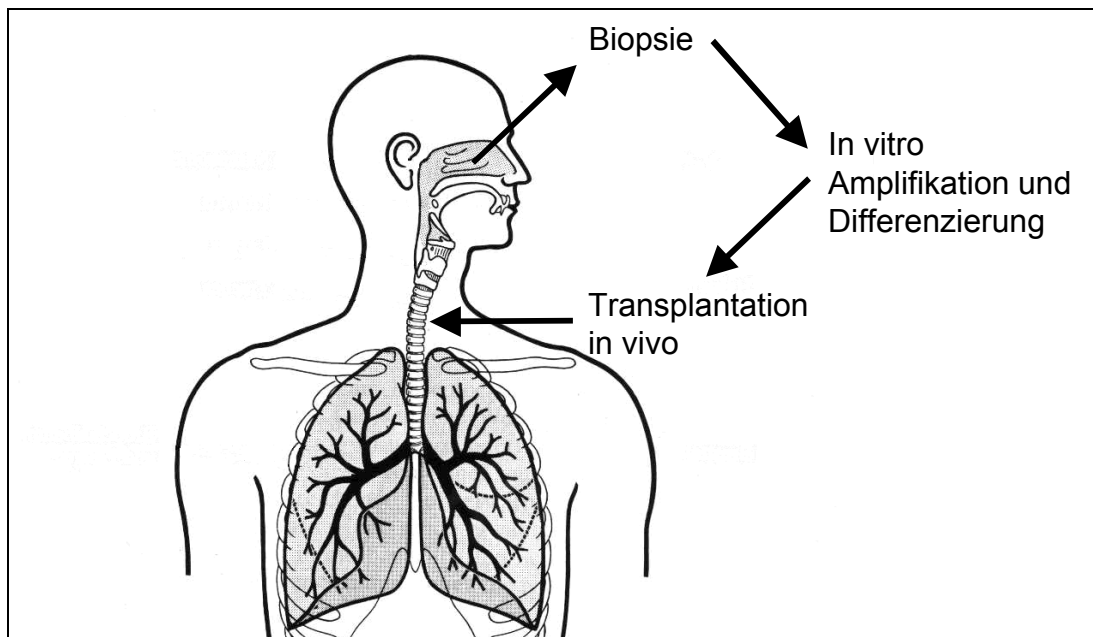


Abb. 4: Schematische Veranschaulichung des Prinzips von Tissue Engineering zur autologen Transplantatherstellung am Beispiel der Trachealrekonstruktion. Geringe Mengen körpereigenes Gewebe werden in einer Biopsie entnommen. Nach Vermehrung außerhalb des Körpers können differenzierte Zellen dazu verwendet werden, geschädigte Organe und ihre Funktionen wiederherzustellen [4].

Erste Schritte zur Defektheilung einer Luftröhre mit den Methoden des Tissue Engineerings sind bereits vollzogen [31]. Bestrebungen, die knorpelige Röhre der Trachea unter Verwendung von autologen Chondrozyten nachzuempfinden, erweisen sich als vielversprechend [37, 38]. Weitere Studien zeigen, dass es möglich ist, bei Versuchstieren die Trachea in vitro vollständig vom Epithel zu befreien, anschließend durch kultivierte Epithelzellen zu reepithelialisieren und das fertige Trachea-Epithel-Transplantat in Nacktmäuse subkutan zu implantieren [26, 39]. Darüber hinaus lässt

sich auch ein alloplastischer Trachealersatz mit einem respiratorischen Epithel auskleiden [14, 40]. Die Besiedelung eines Trachealersatzes mit humanen respiratorischen Epithelzellen (HRE-Zellen) beschränkt sich bisher hauptsächlich auf die Verwendung von Epithelzellgemischen. Alternativ würde die Verwendung einer reinen Population von Vorläuferzellen neue Möglichkeiten eröffnen: Vorläuferzellen besitzen den Vorzug, dass sie eine schier unbegrenzte Proliferationskapazität besitzen und durch Differenzierung die funktionellen Zelltypen eines Gewebes erzeugen [41]. Die Fähigkeit von Vorläuferzellen zur Differenzierung wird u. a. bei mesenchymalen Stammzellen eindrucksvoll demonstriert, da diese pluripotenten Zellen Knochen, Knorpel und Fett bilden können [42].

1.5 Zellmarker zur Gewebecharakterisierung

Lektine und Antikörper eignen sich als Zellmarker zur Charakterisierung des Gewebes aus dem Respirationstrakt, da mit ihnen der Nachweis von spezifischen Antigenen der Epithelzellen gelingt. Lektine werden meist aus Pflanzen isoliert und binden spezifisch an die terminalen Monosaccharide von Kohlenhydraten [43].

Übersicht über die Bindungsspezifität der Lektine:

Lektine:	Spezifische Kohlenhydrate:
Ulex-Europaeus-Agglutinin I (UEA)	α -L-Fukose [43]
Peanut-Agglutinin (PNA)	β -D-Galaktose [43]
Griffonia-Simplicifolia-Agglutinin I B4 (GSA)	α -D-Galaktose [44]

Bei den Antikörpern erweisen sich vor allem extrazelluläre Antigene als interessante Bindungsstellen im Hinblick auf eine mögliche Selektion einzelner Zellen. Das oberflächliche Antigen CD44 (**Abb. 5**) kann über monoklonale Antikörper gebunden und damit spezifisch nachgewiesen werden. Neben einer ubiquitären Standardform CD44S existieren die variablen Isoformen CD44v1 - v10, die aufgrund von alternativem

Spleißen entstehen und sich durch eine restriktivere Spezifität auszeichnen [45]. Die variablen Isoformen CD44v6 und CD44v9 gelten als spezifisch für verschiedene Epithelien und kommen dort vor allem auf Basalzellen vor [46].

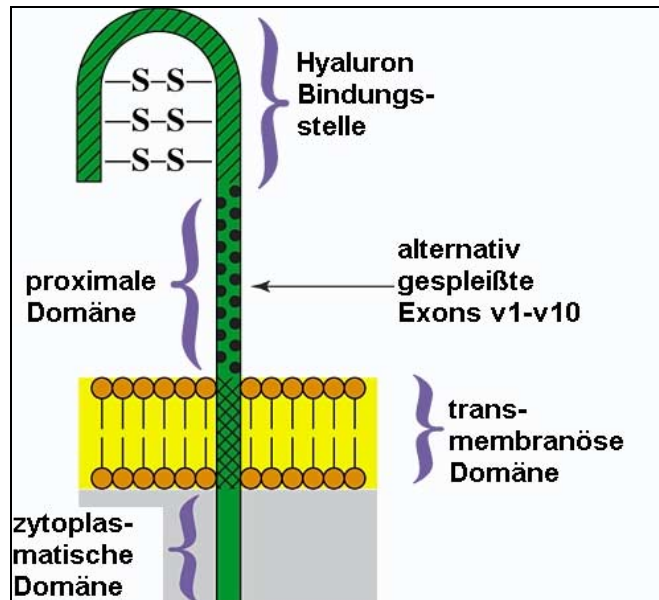


Abb. 5: Struktureller Aufbau des membranständigen Antigens CD44 in seiner Standardform. Durch Einfügen von zusätzlichen Peptidsequenzen entstehen variable Isoformen, wie z. B. CD44v6 und CD44v9. Die variablen Isoformen sind in ihrem Vorkommen und in ihrer Spezifität stärker eingeschränkt (Quelle: Glycoforum, Seikagaku).

1.6 Verfahren der Zellseparation

Für eine erfolgreiche Zellseparation bestehen zwei wesentliche Voraussetzungen. Erstens müssen die Zellen als Einzelzellsuspension vorliegen, was bei flüssigen Geweben wie dem Blut unmittelbar gewährleistet ist. Hingegen erfolgt bei soliden Geweben, wie dem respiratorischen Epithel, zuvor eine Isolierung der Zellen aus dem Gewebeverband mittels enzymatischen Verdaus. Zweitens müssen die einzelnen Zelltypen aus dem Zellgemisch charakteristische Merkmale aufweisen, die eine eindeutige Unterscheidung von einander ermöglichen [47]. Die Merkmale können physikalischer oder immunologischer Natur sein. Physikalische Merkmale sind z. B. Größe und Masse einer Zelle, während oberflächliche Antigene eine immunologische Unterscheidung anhand von monoklonalen Antikörpern gestatten [47].

Die Zelltrennverfahren lassen sich technisch in parallele und serielle Verfahren unterteilen. Bei parallelen Zelltrennverfahren werden viele Zellen gleichzeitig aufgrund einer einzigen Eigenschaft sortiert. Bei seriellen Zelltrennverfahren dagegen werden die Zellen einzeln gemessen und sortiert, wobei mehrere Eigenschaften berücksichtigt werden können [47].

1.6.1 Parallele Zelltrennverfahren

Die parallelen Verfahren Filtration, Lyse und Panning können wegen ihrer Ungenauigkeit hauptsächlich für eine Voranreicherung der Zielzellen eingesetzt werden [47]. Durch Filtration mit Nylongazen definierter Porengröße können störende Zellaggregate eliminiert werden. Die selektive Lyse befreit z. B. das Primärisolat von den Erythrozyten und erleichtert eine Zellzählung. Das Prinzip der Dichtezentrifugation wird bei einem Percoll-Gradienten angewendet [48, 49]. Die Percoll-Lösung einer definierten Dichte ermöglicht es, durch Zentrifugation Erythrozyten und Zelltrümmer mit größerer Dichte aus Zellgemischen zu depletieren. Unter Panning wird die selektive Adhärenz von Zellen an bestimmte Oberflächen verstanden [47].

Wichtigster Vertreter der parallelen Zelltrennverfahren ist die magnetische Zellseparation (MACS, **Abb. 6**). Bei dieser Methode werden die Zielzellen durch Konjugate aus monoklonalen Antikörpern und kleinen superparamagnetischen Partikeln (Microbeads) markiert [50]. Laut Angaben des Herstellers Miltenyi Biotec bestehen die Microbeads aus Dextranpolymeren, mit Eisenoxid beschichtet, und besitzen eine durchschnittliche Partikelgröße von 50 nm. Durch die Kombination eines Permanentmagneten, in dem seltene Erden wie Barium-Neodym enthalten sind, mit Säulen mit einer Matrix aus ferromagnetischen Stahlkugeln können Hochgradienten-Magnetfelder mit der Feldstärke von 1,5 Tesla erzeugt werden. Die magnetische Zellseparation kann, aufgrund der geringen Größe der Apparatur, unter einer sterilen Sicherheitswerkbank erfolgen und ermöglicht später die Kultivierung der separierten Zellpopulationen. Die magnetische Separation lässt sich leicht am Durchflusszytometer kontrollieren, wenn neben magnetisch-konjugierten Antikörpern auch fluorochrom-konjugierte Antikörper eingesetzt werden [47].

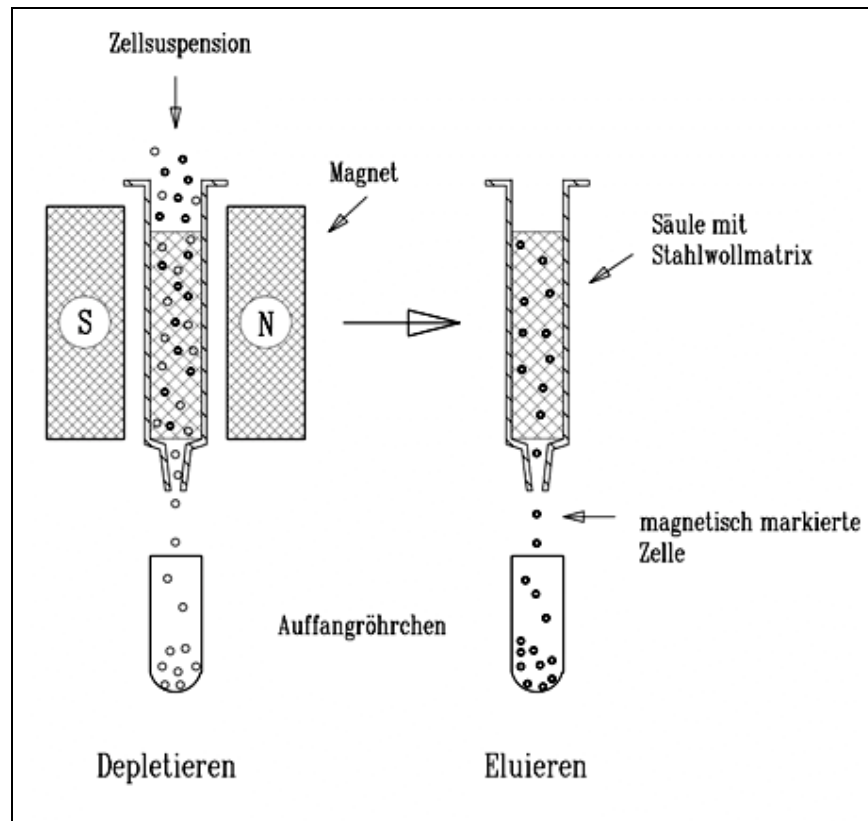


Abb. 6: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation. Innerhalb des Zellgemischs werden die Zielzellen magnetisch markiert. Die Zellsuspension wird nun über eine spezielle Trennsäule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die unmarkierten Zellen passieren die Säule ungehindert, während die markierten Zielzellen zunächst festgehalten und erst später außerhalb des Magnetfeldes ausgespült werden [47].

Die magnetische Separation kann dazu dienen, Basalzellen als Vorläuferzellen aus dem respiratorischen Epithel zu gewinnen, um sie anschließend auf ihre Eignung zur Epithelisierung eines Trachealersatzes zu prüfen. Eine Anreicherung von Basalzellen mittels MACS ist bislang nur für das respiratorische Epithel der Ratte beschrieben; dabei wird das Lektin GSA I B4 als Basalzellmarker verwendet und eine zu 90% reine Population an Basalzellen erzielt [51].

1.6.2 Serielle Zelltrennverfahren

Die Fluoreszenz-aktivierte-Zell-Sortierung (FACS, **Abb. 7**) stellt das einzig relevante Verfahren für serielle Zelltrennung dar. Beim Messvorgang wird eine Zellsuspension,

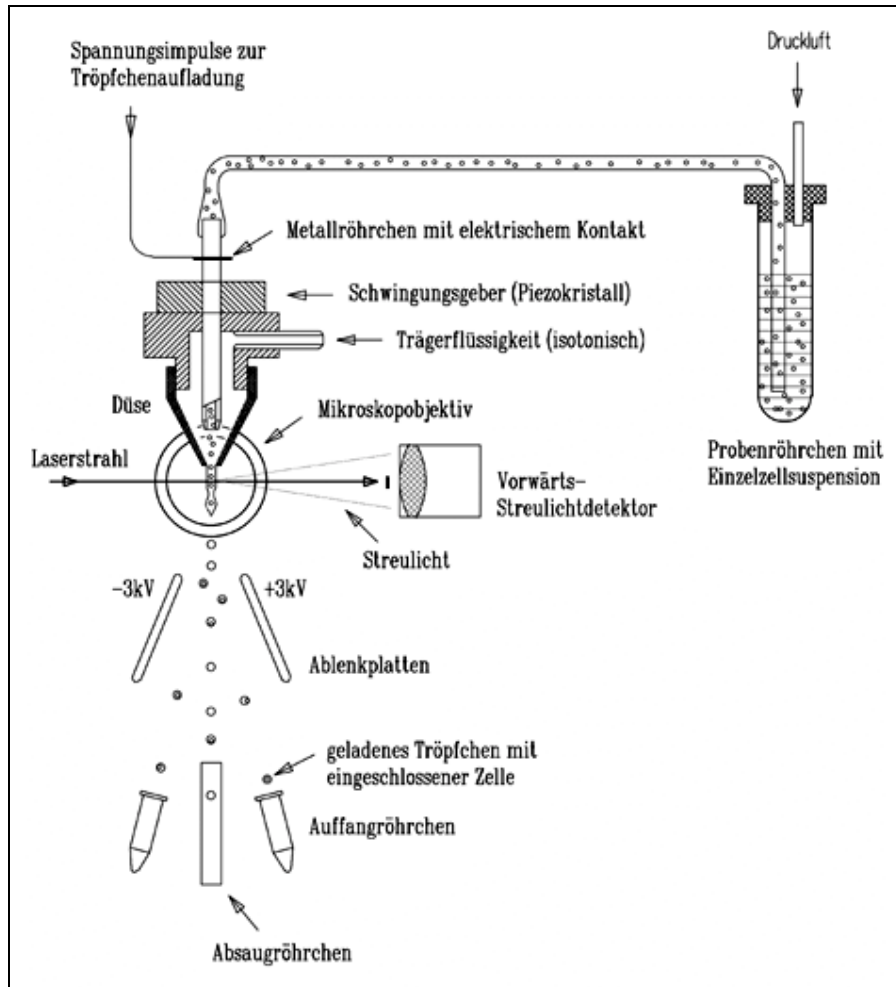


Abb. 7: Schematische Darstellung der Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sortierung. Innerhalb eines Zellgemischs werden die Zielzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Zellsuspension wird dann mit Druckluft angepresst und über einen Schlauch zu einer Düse transportiert. Hier wird nun ein dünner Flüssigkeitsstrahl erzeugt und die Zellen passieren hintereinander einen Laserstrahl. Dabei entsteht Streulicht und die Zielzellen emittieren zusätzlich Fluoreszenzlicht. Danach werden die Zellen einzeln in Tropfen verpackt und wahlweise mit einer positiven oder negativen Ladung versehen. Aufgrund der elektrischen Ladung werden die Zielzellen abgelenkt und getrennt von den unmarkierten Zellen gesammelt [47].

die fluoreszenzmarkierte Zellen enthält, mit Druckluft aus dem Reaktionsgefäß durch einen dünnen Schlauch zu einer Düse transportiert. Dort werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung innerhalb eines Flüssigkeitsstrahles stark beschleunigt und müssen am Analysepunkt einen Laserstrahl passieren, wobei sie das Licht in verschiedene Richtungen streuen. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter) ist dabei ein relatives Maß für die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (side scatter) Auskunft über die Granularität der Zellen gibt [47]. Fluoreszenzmarkierte Zellen emittieren zusätzlich Fluoreszenzlicht mit einer spezifischen Wellenlänge. Am Abrisspunkt werden die Zellen selektiv mit einer negativen oder positiven elektrischen Ladung versehen, durch einen piezoelektrischen Schwingungsgeber stabilisiert in Tropfen verpackt und anschließend in einem statisch elektrischen Feld in verschiedene Auffangbehälter abgelenkt [47].

Mittels FACS kann eine fluoreszenzmarkierte Zellsuspension entweder rein analytisch betrachtet oder in verschiedene Fraktionen separiert werden. Unter Verwendung von Lektin GSA I B4 konjugiert mit Fluoreszein ist bei Ratten mittels FACS eine Anreicherung von Basalzellen aus dem respiratorischen Epithel möglich [27]. Analog ergibt sich mittels FACS bei der Separation von Basalzellen aus dem humanen respiratorischen Epithel mit GSA-I-B4-FITC eine Population von 80%iger Reinheit [52]. Im Hinblick auf eine Kultivierung erscheint es jedoch problematisch, dass die Vitalität der Zellen aufgrund der vorherrschenden Scherkräfte im FACS auf ca. 60% absinkt [27, 52].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Hinblick auf die Herstellung eines humanen Trachealersatzes soll untersucht werden, unter welchen Bedingungen dies durch den Einsatz von Tissue Engineering in vitro möglich ist. Für einen optimalen Trachealersatz ist, neben einer bewegungs- und druckstabilen Röhre aus Knorpelspannen, die Anwesenheit eines differenzierten zilien-tragenden Epithels notwendig. Die Basalzellen gelten als die Vorläuferzellen des humanen respiratorischen Epithels und verfügen dementsprechend über eine ausreichende Proliferationskapazität und über das Potenzial zur Differenzierung.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit lauten:

- a) Isolierung der humanen respiratorischen Epithelzellen mittels enzymatischen Verdauens unter Berücksichtigung der Vitalität.
- b) Kultivierung der humanen respiratorischen Epithelzellen zur Amplifikation bei gleichzeitiger Erhaltung der typischen morphologischen Eigenschaften.
- c) Magnetische Separation der Vorläuferzellen aus humanem respiratorischem Epithel durch Verwendung spezifischer Zellmarker.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	Dako
Aceton/Methanol 1:1	J. T. Baker
Anti-FITC-Microbeads	Miltenyi Biotec
Antikörper-Verdünnungs-Puffer	Dako
Bisbenzimid 10 µg/ml	Sigma
Bovines-Serum-Albumin (BSA)	Sigma
Dispase II 2,4 U/ml	Roche
Essigsäure 99%	J. T. Baker
Ethanol 100%	J. T. Baker
Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)	Fluka Chemie
FACS-Clean mit 1% CI	Becton Dickinson
Fetal-Bovine-Serum (FBS)	Biochrom AG
Fluoreszenz-Eindeck-Medium	Dako
Formaldehyd 4%	Herbeta-Arzneimittel
Goat-Anti-Mouse-IgG-Microbeads	Miltenyi Biotec
Hanks Salzlösung mit Phenolrot	Biochrom AG
Horse-Radish-Peroxidase (HRP)	Dako
Kollagen A 1 mg/ml	Biochrom AG
MACS-Puffer (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA)	Miltenyi Biotec
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml/10000 µg/ml	Biochrom AG
Percoll Separation Solution 1.073 g/ml	Biochrom AG

Peroxidase-Inhibitor	Dako
Phosphate-Buffered-Saline (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG
Propidiumiodid (PI) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Sigma
Proteinblock mit Kasein 0,25%	Dako
Tryphanblau 0,4%	Sigma
Trypsin 0,5%/EDTA 0,2%	Biochrom AG

2.1.2 Geräte

CO_2 -Begasungsbrutschrank Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH
FACS LSR mit MAC-G4-Computer	BD Biosciences
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Gesellschaft für Labortechnik
Kryostat CM1900	Leica
Low Profile Roller	New Brunswick Scientific
MACS Multistand	Miltenyi Biotec
Mikroskop AX 70 mit Digitalkamera C4742-95	Hamamatsu
Mikroskop CK 40 mit Digitalkamera C-2020Z	Olympus
Mikroskop CX 41 mit Digitalkamera C-2020Z	Olympus
Mini-MACS-Magnet	Miltenyi Biotec
Neubauer Hämozytometer	Paul Marienfeld
Sicherheitswerkbank Hera Safe Klasse 2 Typ H	Heraeus Instruments GmbH
Trennsäulen Typ MS+	Miltenyi Biotec
Vorfilter 30 μm Porengröße	Miltenyi Biotec
Wärmeschrank Function Line 37°C	Heraeus Instruments GmbH

Wasserbad Typ 1003

Gesellschaft für Labortechnik

Zentrifuge 5804 mit Ausschwingrotor Typ 16A-4-44 Eppendorf

2.1.3 Zellkultur

Zellquelle:

In der vorliegenden Arbeit wurden humane respiratorische Epithelzellen (HRE-Zellen) untersucht. Diese stammten aus den Conchae nasales inferiores, die im Rahmen einer Konchotomie entnommen wurden. Die Patienten wurden ordnungsgemäß informiert und es wurde nur Gewebe verwendet, welches ansonsten verworfen worden wäre. Ein Votum der Ethikkommission der Charité lag vor. Zur Standardisierung der Proben wurden die Daten Alter, Geschlecht, Raucher, Nichtraucher, Allergiker und Nicht-allergiker in anonymer Form erhoben. Die Proben stammten von insgesamt 80 Patienten im Alter von 16 bis 64 Jahren. Das durchschnittliche Alter der 22 Patientinnen betrug 39 ± 16 Jahre und das der 58 männlichen Patienten lag bei 41 ± 12 Jahre.

Kulturgefäße:

T25-Kulturflaschen	25 cm ²	Nunc
6-Well-Kulturplatten	9,6 cm ² /Well	Falcon
Cellagen-Discs-CD-6	5,7 cm ²	ICN
12-Well-Kulturplatten	4,2 cm ² /Well	Nunclon
8-Well-Chamber-Slides	1,0 cm ² /Well	Lab-TEK

Kulturmedien und Zusätze:

serumfreies AECGM (Promo Cell) + 2% Supplement Mix + 1% Pen/Strep

- Adrenalin 0,5 µg/ml
- Bovine Pituitary Extract 0,4%
- Epidermal Growth Factor 0,5 ng/ml
- Hydrokortison 0,5 µg/ml
- Insulin 5 µg/ml
- Transferrin 10 µg/ml
- Triiodthyronin 6,7 ng/ml
- Retinsäure 0,1 ng/ml

RPMI 1640 (Biochrom AG) + 10% FBS + 1% Pen/Strep

- HEPES 25 mM
- N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin 0,532 g/l
- NaCl 5,5 g/l
- NaHCO₃ 2 g/l
- Phenolrot 5 mg/l

2.1.4 Histologie

Alcianblau 8GX

Sigma

Kernechtrot-Aluminiumsulfat

Merck

2.1.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Lektine:

Griffonia-Simplicifolia-Agglutinin-I-B4-FITC (GSA)	10 µg/ml	Sigma
Peanut-Agglutinin-Fluoreszein (PNA)	25 µg/ml	Vector
Ulex-Europaeus-Agglutinin-I-Rhodamine (UEA)	20 µg/ml	Vector

Antikörper:

CD44S Mouse-Anti-Human IgG1	36 µg/ml	Dako
CD44v6 Mouse-Anti-Human IgG1 (Klon VFF-18)	5 µg/ml	Bender
CD44v6-FITC Mouse-Anti-Human IgG1	5 µg/ml	Bender
Cytokeratin HMW Mouse-Anti-Human IgG1 (Klon 34βE12)	1 µg/ml	Dako
Mouse IgG1 Negativkontrolle	1 µg/ml	Dako

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung und Kultivierung

Im HNO-OP wurden Nasenmuscheln entnommen und in 50 ml Falcon-Röhrchen mit RPMI-Medium transportiert. Die Isolierung der HRE-Zellen erfolgte mittels enzymatischem Verdau mit Dispase II 2,4 U/ml bei 4°C über Nacht (ca. 16h). Danach ließen sich die HRE-Zellen mit einem Skalpell leicht von dem Bindegewebe ablösen und in Hanks Salzlösung aufnehmen. Durch zweimaliges Zentrifugieren bei 600 g für 5 min und Resuspendieren konnten die Zellen vereinzelt und extrazelluläre Substanzen ausgewaschen werden.

Zur Kultivierung wurden die HRE-Zellen in AECG-Medium aufgenommen und bei standardisierter Zelldichte von 12.000 Zellen/cm² ausgesät. Die Kultivierung der Zellen fand im Brutschrank bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5% statt. Zur optimalen Nährstoffversorgung der Zellen war ein Mediumwechsel mit AECGM alle zwei bis drei Tage notwendig.

Beschichten von Kulturoberflächen mit Kollagen A:

Pro 10 cm² Kulturoberfläche wurde 1 ml einer 1:1 Kollagen A in PBS Verdünnung in das Kulturgefäß gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und das Kulturgefäß sofort verwendet oder ggf. mit PBS überschichtet und bei 4°C für maximal eine Woche gelagert.

Passagieren der Zellen:

Damit eine adhärente Zellkultur in ein neues Kulturgefäß überführt werden konnte, musste sie passagiert werden. Die Passage erfolgte bei Konfluenz, d. h. zu diesem Zeitpunkt wurde die Kulturoberfläche vollständig von Zellen bedeckt. Um die Zellen von der Oberfläche abzulösen, wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-Lösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion ließ sich mit dem doppelten Volumen an serumhaltigem RPMI-Medium abstoppen. Im Anschluss wurde 5 min bei 600 g zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in AECG-Medium entsprechend der Pelletgröße resuspendiert.

Zellzählung:

Die Vitalität der Zellen ließ sich mit Tryphanblau in einer 1:1-Verdünnung bestimmen. Die toten Zellen färbten sich blau an, während lebende Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt blieben. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauer Zählkammer. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel angewandt [53]:

$$ZZ = A \div 4 \times B \times C \times 10^4$$

<i>ZZ</i>	=	<i>Gesamtzellzahl</i>
<i>A</i>	=	<i>Anzahl der Zellen in 4 großen Quadraten</i>
<i>B</i>	=	<i>Verdünnungsfaktor</i>
<i>C</i>	=	<i>Volumen der Zellsuspension in ml</i>

Zur Erythrolyse erwies es sich als geeignet, 1%ige Essigsäure zu verwenden, die zu gleichen Volumina mit der Zellsuspension gemischt wurde. Die Erythrolyse setzte nach ca. 5 min ein. Der methodische Fehler der Zellzählung betrug mindestens 10% [54].

2.2.2 Adhärenzverhalten

Zur Untersuchung des Adhärenzverhaltens der HRE-Zellen wurden Kulturgefäße aus Polystyrol in Gruppe 1 mit Kollagen A beschichtet und als Kontrolle in Gruppe 2 ohne Beschichtung miteinander verglichen. Als Kulturgefäße wurden 6-Well-Platten verwendet. Die Besiedelung erfolgte jeweils mit Zellen der ersten Passage (P1) eines Patienten mit einer Dichte von 100.000 Zellen/Well. Von den 100.000 Zellen wurden zu vier Zeitpunkten nach 8h, 12h, 16h und 20h die nicht-adhärennten Zellen durch zweimal Waschen mit PBS ausgespült und die verbleibenden adhärennten Zellen in dreifacher Bestimmung ausgezählt.

2.2.3 Populationsverdoppelungszeit

Für die Ermittlung der Populationsverdoppelungszeit einer Zellkultur, musste der Wachstumsverlauf festgehalten werden. Zu diesem Zweck wurden zwei 12-Well-Platten mit Kollagen A beschichtet und mit HRE-Zellen aus der P1 eines Patienten mit der Dichte von 50.000 Zellen/Well besiedelt. Die Auszählung der Zellzahlen erfolgte zu den Zeitpunkten 12h, 24h, 2d bis 5d, sowie nach 7d und 10d in Dreifachbestimmung. Die Populationsverdoppelungszeit ließ sich aus der exponentiellen Wachstumsphase nach folgender Formel bestimmen [53]:

$$t_{PD} = \frac{\log 2 \times t}{\log N - \log N_0}$$

$$\begin{aligned} t_{PD} &= \text{Populationsverdoppelungszeit} \\ N_0 &= \text{Ausgangszellzahl} \\ N &= \text{Zellzahl im exponentiellen Wachstum} \\ t &= \text{Zeit nach Aussaat} \end{aligned}$$

2.2.4 Expansionsstudie

Um die Proliferationskapazität der HRE-Zellen zu untersuchen, wurde die Kultivierung über mehrere Passagen beobachtet. In jeweils zwei Kollagen-A-beschichtete T25-Kulturflaschen wurden pro Patient 300.000 Zellen aus dem Primärisolat ausgesät. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und anschließend passagiert. Die passagierten Zellen wurden lediglich in zwei T25-Kulturflaschen mit jeweils 300.000 Zellen subkultiviert. Die gesamte Expansion (**Abb. 8**) erfolgte nach dem gleichen Schema über mindestens vier Passagen. Abbruchskriterien waren Stagnation des Zellwachstums, eine Vitalität unter 60% oder eine starke Veränderung der Zellmorphologie.

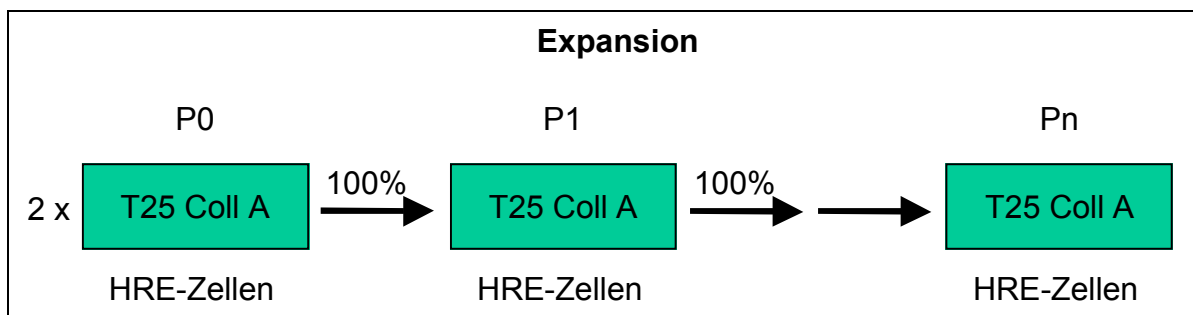


Abb. 8: Schematische Darstellung der Expansionsstudie. Die humanen respiratorischen Epithelzellen wurden in standardisierter Dichte in Kollagen-A-beschichteten T25-Kulturflaschen ausgesät und jeweils bis zum Erreichen der Konfluenz über mindestens vier Passagen kultiviert, um ihre Proliferationskapazität zu ermitteln.

2.2.5 Differenzierung im Air-Liquid-Interface

Zur Differenzierung der HRE-Zellen wurde die Methode des Air-Liquid-Interfaces (ALI, **Abb. 9**) angewandt. Hierzu wurden Cellagen Discs mit einer transparenten permeablen Membran aus Kollagen Typ I verwendet. Die Cellagen Discs wurden zentriert in das Well einer 6-Well-Platte eingesetzt und mit 2,5 ml AECG-Medium im Well und 1,0 ml AECGM auf der Membran für ca. 30 min bei 37°C im Brutschrank konditioniert. Danach wurden 70.000 HRE-Zellen auf der Oberseite der Membran ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium von der Oberseite abgenommen. Die Versorgung der HRE-Zellen mit Nährstoffen war durch einen zweitägigen Mediumwechsel im Well und durch die Diffusion des Mediums durch die permeable Membran gewährleistet.

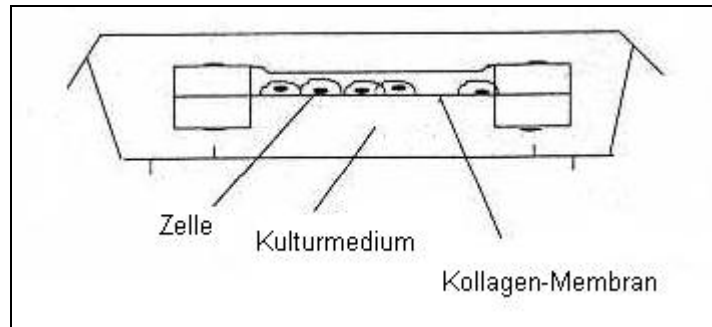


Abb. 9: Differenzierung von Zellen im Air-Liquid-Interface (ALI). Die humanen respiratorischen Epithelzellen wurden auf einer Kollagenmembran in einem Zwei-Phasen-System (Gas- und Flüssigkeitsphase) kultiviert und erhielten dadurch eine polare Ausrichtung.

Die Kultivierung im ALI erfolgte mit HRE-Zellen aus der P0 bis zum Erreichen der Konfluenz und mit HRE-Zellen aus der P1 bis zur Konfluenz sowie bis acht Tage nach Konfluenz. Zur anschließenden immunhistochemischen Auswertung der ALI-Kulturen musste die Kollagenmembran ausgeschnitten und in Aceton/Methanol 1:1 fixiert werden.

2.2.6 Magnetische Separation von Vorläuferzellen

Für die magnetische Separation (MACS) von Vorläuferzellen aus dem humanen respiratorischen Epithel erfolgte die Herstellung von Einzelzellsuspensionen mit 5 Mio. Zellen auf 100 µl MACS-Puffer entweder mittels Dispase-Verdau von nativem Gewebe oder durch Trypsinieren von Zellen in Primärkultur. Um die Epitope auf den Zellen zu erhalten, wurde ein modifizierter Enzymverdau angewandt. Anstatt 16h über Nacht bei 4°C zu verdauen, wurde ein 2h-Verdau mit Dispase II 2,4 U/ml auf einer Rollerapparatur bei 37°C durchgeführt. Nach der Aufarbeitung der Nasenmuscheln folgte ein Percoll-Gradient zur Entfernung der Erythrozyten. So entstand ein Zellgemisch, das sich aus Basalzellen, Becherzellen und Zilienzellen zusammensetzte und unter dem Begriff Originalfraktion subsumiert wurde.

Dichtezentrifugation mit dem Percoll-Gradienten:

Der Percoll-Gradient (**Abb. 10**) diente der Depletierung von Erythrozyten und von Zelldebris. Das durch Dispase-Verdau gewonnene Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen. In zwei 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 20 ml Percoll-Lösung der Dichte 1.073 g/ml vorgelegt und verwirblungsfrei mit je 5 ml Zellsuspension überschichtet. Es wurde mit 900 g für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Über dem Percoll bildete sich ein transparenter Ring aus HRE-Zellen, der vorsichtig mit einer Pipette abgenommen wurde, ohne die Percoll-Phase zu durchstoßen. Es folgte ein Waschschrift mit dem doppelten Volumen an PBS und Zentrifugation bei 600 g für 5 min. Anschließend wurde das gewonnene Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

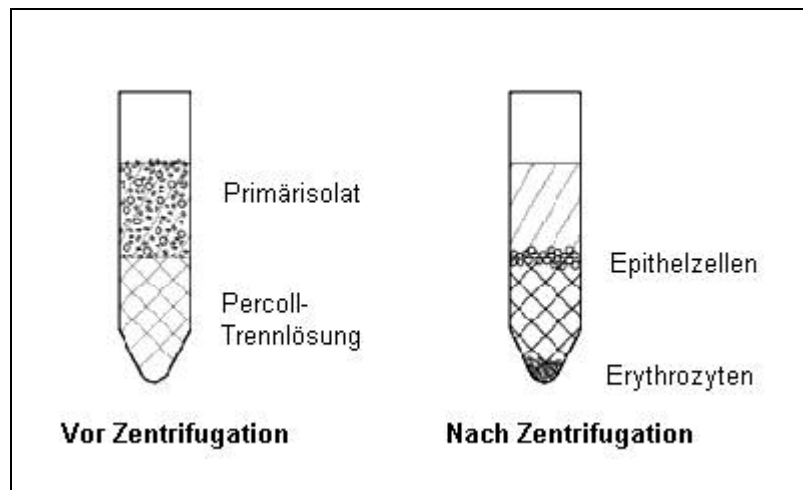


Abb. 10: Dichtezentrifugation mit einem Percoll-Gradienten. Die Percoll-Lösung wurde mit der Zellsuspension überschichtet. Durch die Zentrifugation bildete sich über der Percoll-Lösung eine ringförmige Phase aus vitalen humanen respiratorischen Epithelzellen. Die Erythrozyten und die Zelltrümmer sedimentierten aufgrund ihrer größeren Dichte auf dem Boden des Falcon-Röhrchens [47].

Protokoll zur magnetischen Markierung von Zellen in Suspension:

Die Färbung der Basalzellen erfolgte 30 min bei 4°C mit austitrierten Markerreagenzien, d. h. die eingesetzten Konzentrationen waren so hoch wie möglich, ohne dabei zu einer unspezifischen Bindung von anderen Zellen zu führen. Insgesamt kamen vier verschiedene Markerreagenzien für Basalzellen zur Anwendung:

Basalzellmarker:		Magnetische Partikel:	
GSA-I-B4-FITC	10 µg/ml	Anti-FITC-Microbeads	10 µl
CD44S	36 µg/ml	Goat-Anti-Mouse-IgG-Microbeads	20 µl
CD44v6	5 µg/ml	Goat-Anti-Mouse-IgG-Microbeads	20 µl
CD44v6-FITC	5 µg/ml	Anti-FITC-Microbeads	10 µl

Die Zellen wurden anschließend mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen, für 5 min bei 300 g zentrifugiert, und danach wurde der Überstand verworfen. Zum Resuspendieren des Zellpellets wurden 80 µl (bzw. 90 µl) MACS-Puffer verwendet und mit 20 µl (bzw. 10 µl) Microbeads auf ein Gesamt-Volumen von 100 µl aufgefüllt, gut durchmischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 5 ml MACS-Puffer folgte die magnetische Separation.

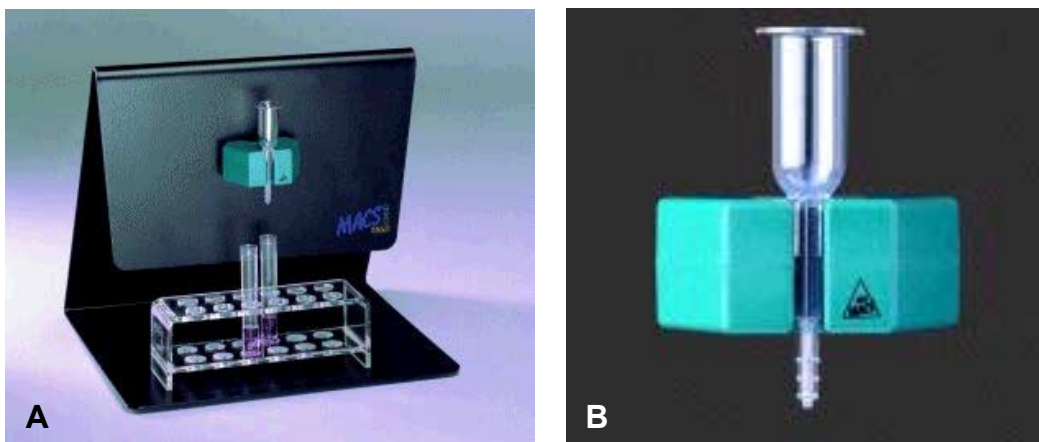


Abb. 11: Darstellung des Versuchsaufbaus zur magnetischen Separation (Miltenyi Biotec). Die Apparatur für die magnetische Separation bestand aus einer Halterung, einem Magneten und einer Trennsäule, sowie Röhrchen zum Auffangen der sortierten Zellen (**A**). Vergrößerte Darstellung der Separationseinheit bestehend aus Hochleistungsmagneten und Trennsäule Typ MS+ für die positive Selektion (**B**).

Für eine kritische Beurteilung der magnetischen Separation war es notwendig, die Bindungsspezifitäten eingehend zu untersuchen. Die Spezifität der primären Markerreagenzien wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen und von Immunfluoreszenzfärbungen an nativen und an kultivierten HRE-Zellen überprüft. Um eine unspezifische Bindung der Microbeads z. B. an tote Zellen auszuschließen, wurden im MACS unmarkierte Zellen nur mit Microbeads inkubiert über die Trennsäule gegeben.

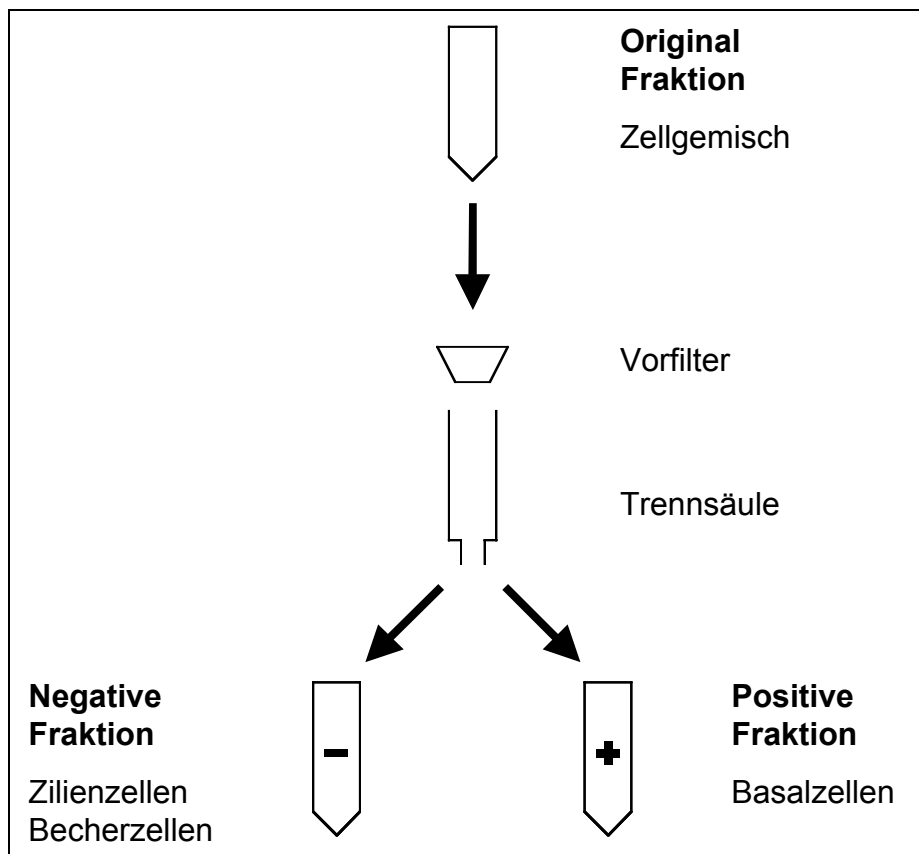


Abb. 12: Schematischer Ablauf der magnetischen Separation von Basalzellen aus dem Zellgemisch der humanen respiratorischen Epithelzellen. Die Originalfraktion beinhaltete noch alle drei Zelltypen: Zilienzellen, Becherzellen und Basalzellen. Die Basalzellen wurden mit Konjugaten aus spezifischen monoklonalen Antikörpern (bzw. Lektinen) und Microbeads markiert. Dies ermöglichte im Magnetfeld ihre Bindung an die Säulenmatrix, während die unmarkierten Zilien- und Becherzellen ungehindert die Trennsäule passierten und die negative Fraktion bildeten. Nach Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld konnten dann die Basalzellen als positive Fraktion eluiert werden.

Magnetische Separation mit Trennsäulen für die positive Selektion:

Zur positiven Selektion der Basalzellen wurde eine Trennsäule vom Typ MS+ gewählt und mit Hilfe einer Halterung (MACS Multistand) senkrecht in den Magneten eingespannt (**Abb. 11**). Zur Entfernung von noch vorhandenen Zellaggregaten wurde die Zellsuspension mit einem Vorfilter aus Nylongaze mit 30 µm Porengröße filtriert. Die Trennsäule wurde mit 500 µl MACS-Puffer vorgespült und die gefärbte Zellsuspension in 1 ml MACS-Puffer über die Säule gegeben. Im Anschluss wurde mit 4 × 500µl MACS-Puffer nachgespült und der Durchlauf, der aus unmarkierten Zellen bestand, als negative Fraktion gesammelt. Danach wurde die Trennsäule aus dem Magnetfeld genommen, auf einem Falcon-Röhrchen platziert, mit 1 ml MACS-Puffer aufgefüllt und die markierten Zielzellen wurden mit einem Stempel als positive Fraktion eluiert (**Abb. 12**).

Auswertung und Kultivierung der magnetisch separierten Zellpopulationen:

Für die Auswertung der magnetischen Separation waren die Originalfraktion im ungefärbten und gefärbten Zustand, die negative Fraktion und die positive Fraktion von Interesse. Da die Microbeads mit 50 nm im Lichtmikroskop nicht sichtbar waren, wurden die magnetisch und fluoreszenzmarkierten Zellen im Anschluss mit dem Durchflusszytometer analysiert. Alternativ erwies sich die semiquantitative Auswertung am Fluoreszenzmikroskop aufgrund der geringen Intensität des Farbstoffes FITC als wenig praktikabel und wurde nicht weiter verfolgt. Die Zellzahlbestimmung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit dem Neubauer Hämocytometer. Aufgrund der geringen Größe der Apparatur konnte die gesamte magnetische Separation an der Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen stattfinden. Dies eröffnete anschließend die Möglichkeit, die Zellen aus den einzelnen Fraktionen unter Verwendung von Kollagen-A-beschichteten T25-Kulturflaschen zu kultivieren.

Analyse der Zellseparation mit dem Durchflusszytometer:

Die Analyse der magnetischen Separation und Identifizierung der Zellen erfolgte mit dem Durchflusszytometer (FACS, **Abb. 13**). Dazu wurden im Anschluss an die magnetische Separation Zellsuspensionen mit 250.000 Zellen pro 1ml MACS-Puffer (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) hergestellt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)

abgefüllt und stetig bei 4°C gekühlt. Die ungefärbte, sowie die gefärbte Originalfraktion und die negative ebenso wie die positive Fraktion wurden mit je 10.000 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die ungefärbte Originalfraktion diente dabei als Kontrolle, um die Eigenfluoreszenz der Zellen von der Fluoreszenz der FITC-positiven Zellen abzugrenzen. Zur Signalgebung im Durchflusszytometer wurden die Zellen mit 5 µg/ml CD44v6-FITC markiert. Alternativ wurde mit 5 µg/ml CD44v6 als Primärantikörper inkubiert und mit Rabbit-Anti-Mouse-IgG-FITC (Dako) 1:20 nachgefärbt, was allerdings zu unspezifischer Bindung des Sekundärantikörpers führte und deshalb ungeeignet war. Kurz vor der Messung wurden die Proben 5 min mit 5 µg/ml Propidiumiodid (PI) inkubiert. Das basische PI interkalierte in die saure DNA von toten Zellen und erlaubte so die Vitalitätsbestimmung der Zellen.



Abb. 13: Durchflusszytometer vom Typ LSR (Becton Dickinson), ausgestattet mit einem primären 488 nm Argon-Ionen-Laser. Gemessen wurden die Fluoreszenzfarbstoffe FITC in Kanal FL1 und PI in Kanal FL3.

Die Messungen erfolgten an einem Durchflusszytometer vom Typ LSR mit drei verschiedenen Lasern (325 nm Helium-Cadmium, 488 nm Argon-Ionen, 633 nm Helium-Neon) und sechs Fluoreszenzkanälen FL1 bis FL6. Das Durchflusszytometer wurde vor Beginn der Messung mit 10%iger FACS-Clean-Lösung und mit destilliertem H₂O durchgespült, zwischen den einzelnen Messungen nur mit destilliertem H₂O durchgespült, um

Verunreinigungen vorzubeugen. Im Kanal FL1 wurde das emittierte Fluoreszenzlicht des Farbstoffes FITC gemessen und im Kanal FL3 das von PI. Mit Hilfe der Software Cellquest (Becton-Dickinson) wurde jede Zelle entsprechend ihrem Wert für den ersten Parameter FITC (X-Achse) und den zweiten Parameter PI (Y-Achse) als Punkt in einem zweidimensionalen Dot-Plot-Diagramm abgebildet und ausgewertet.

2.2.7 Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Die Färbungen wurden pro Färbemethode bei n = 3 verschiedenen Patienten durchgeführt.

Histologie mit der Alcianblau-Färbung:

Für die histologische Untersuchung wurden am Kryostat 6 µm dicke Querschnitte der Nasenmuscheln angefertigt und bei -20°C gelagert. Die Fixierung erfolgte 5 min in Aceton/Methanol im Verhältnis 1:1. Zur Färbung wurde 1%ige Alcianblau-Lösung für 30min eingesetzt, deren pH-Wert auf 2,5 mit 3%iger Essigsäure eingestellt wurde. Die Gegenfärbung erfolgte mit Kernechtrot für eine Inkubationszeit von 5 min. Es schloss sich eine Dehydrierung für jeweils 5 min mit 96%igem und mit 100%igem Alkohol an. Mit Xylol wurde der Alkohol ausgewaschen, die Konservierung in Kanadabalsam vorgenommen. Die sauren Mukopolysaccharide der sekretorischen Zellen wurden blau angefärbt, während die Zellkerne rot erschienen.

Immunhistochemie mit Immunperoxidase-Färbung:

Die Immunperoxidase-Färbung (**Abb. 14**) mit dem EnVision™-System verwendete unkonjugierte Primärantikörper gegen das Antigen und Konjugate mit einem Dextran-Rückgrat, an welches Anti-Maus-Sekundärantikörper und das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt waren, was eine Färbung in zwei Schritten ermöglichte.

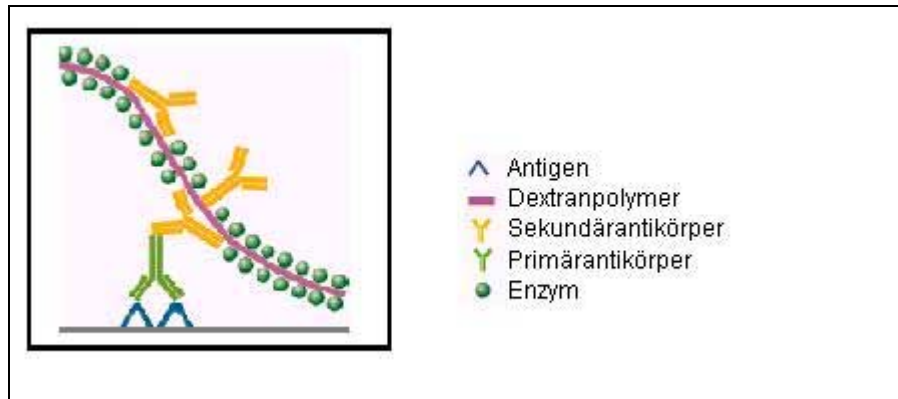


Abb. 14: Immunperoxidase-Färbung mit dem EnVision™-System (Dako) in zwei Schritten. Schritt 1 bestand aus der Inkubation mit einem für das nachzuweisende Antigen spezifischen Primärantikörper aus der Maus. In Schritt 2 erfolgte die Inkubation mit einem Anti-Maus-Sekundärantikörper, der zusammen mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) an ein Dextranpolymer gebunden war. Die spezifische Umsetzung des Substrats AEC durch das Enzym HRP führte zu einer Rotfärbung.

Zunächst wurden die Präparate 5 min in Aceton/Methanol 1:1 fixiert. Zur Trocknung wurden sie 20 min im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt. Die weiteren Schritte erfolgten in einer Feuchtkammer. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate 5 min mit Peroxidase-Inhibitor-Lösung inkubiert. Danach wurde 5 min mit PBS gewaschen. Es folgten die Proteinblockierung mit Kasein für 20 min bei 37°C, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, und 5 min Waschen mit PBS. Jetzt konnte der primäre Antikörper aufgetragen werden, dann wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschritte für 5 min mit PBS. Danach wurde für 30 min bei 37°C das Enzym HRP aufgetragen. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde das gebrauchsfertige Substrat AEC auf die Präparate getropft und 10 min inkubiert. Das Enzym HRP katalysierte die Oxidation des Substrats AEC zu einem roten Farbstoff. Nach Spülung mit destilliertem H₂O erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin 1:5 und die Bläuung der Zellkerne für 15 min in H₂O aus der Leitung. Die Präparate wurden in Aquatex eingedeckt und die Färbung wurde mikroskopisch ausgewertet.

Immunfluoreszenz-Färbung mit Lektinen und Antikörpern:

Die Präparate wurden 5 min in Aceton/Methanol 1:1 fixiert und bei 37°C für 20 min getrocknet. Nach 20 min Proteinblockierung mit Kasein bei 37°C und 5 min Waschen mit PBS konnten die fluoreszenzmarkierten Antikörper oder Lektine 30 min bei 37°C aufgetragen werden. Schließlich wurden die Präparate zweimal für 5 min mit PBS gewaschen, optional mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimidide die Zellkerne gegengefärbt, noch einmal mit PBS gewaschen und in Fluoreszenzmedium eingedeckt.

2.2.8 Statistik

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert \pm der Standardabweichung. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt.

Varianzanalyse nach Brunner:

Zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen Messergebnissen wurde bei der Adhärenzstudie für $n = 5$ Patienten eine nichtparametrische Varianzanalyse für longitudinale Daten nach Brunner durchgeführt [55]. Die Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SAS 8.2 vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Kultivierung

Die resezierten Nasenmuscheln sind durchschnittlich 2,7 cm lang mit einer Standardabweichung von $\pm 0,7$ cm. Bei der Aufarbeitung von $n = 30$ Nasenmuscheln ergibt sich im Mittelwert eine Zellzahl von 7,1 Mio. $\pm 4,4$ Mio. Zellen pro Nasenmuschelpaar.

Durch die Alcianblau-Färbung (**Abb. 15**) an Kryoschnitten von nativem respiratorischem Gewebe wird das Sekret der Becherzellen blau gefärbt. Auf der Oberfläche des Epithels sind die Kinozilien der Zilienzellen zu sehen. Die Färbung mit Kernechtrot bewirkt eine Rotfärbung der Zellkerne. Da die Basalmembran frei von Zellkernen ist, lässt sie sich als Aussparung erkennen. Die Basalzellen befinden sich unmittelbar über der Basalmembran und lassen sich aufgrund der Lage identifizieren. Unterhalb der Basalmembran befindet sich eine Bindegewebsschicht, die als Lamina propria mucosae bezeichnet wird.

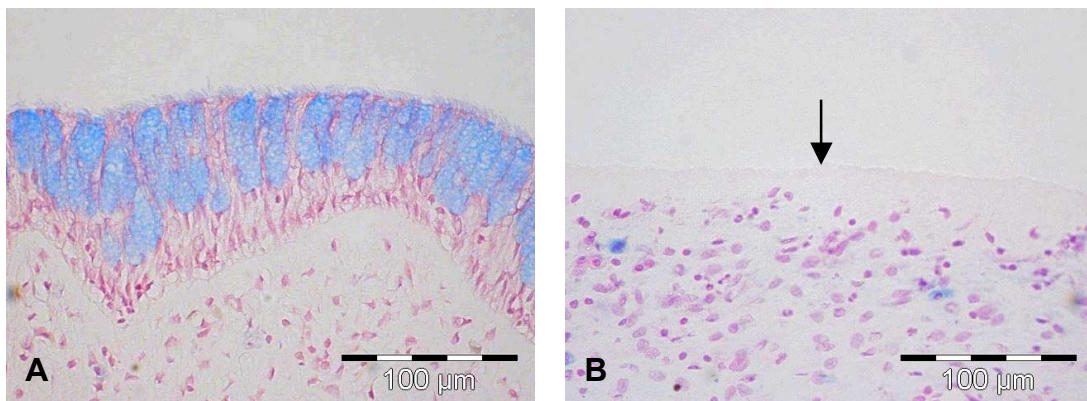


Abb. 15: Links ist die Alcianblau-Färbung der Nasenmuschel im nativen Zustand zu sehen (400 \times). Das Sekret der Becherzellen wird blau gefärbt, die Basalmembran ist als Aussparung zu erkennen (**A**). Rechts wird die Nasenmuschel nach Dispase-Einwirkung und Präparation mit dem Skalpell ohne Epithel abgebildet. Die Basalmembran (\downarrow) bleibt vollständig erhalten (**B**).

Im Rahmen der Präparation wird das respiratorische Epithel vollständig von der Lamina propria abgelöst. Die Basalmembran bleibt dabei, trotz Dispase-Einwirkung und Präparation mit dem Skalpell, als Barriere zum Bindegewebe weitgehend erhalten.

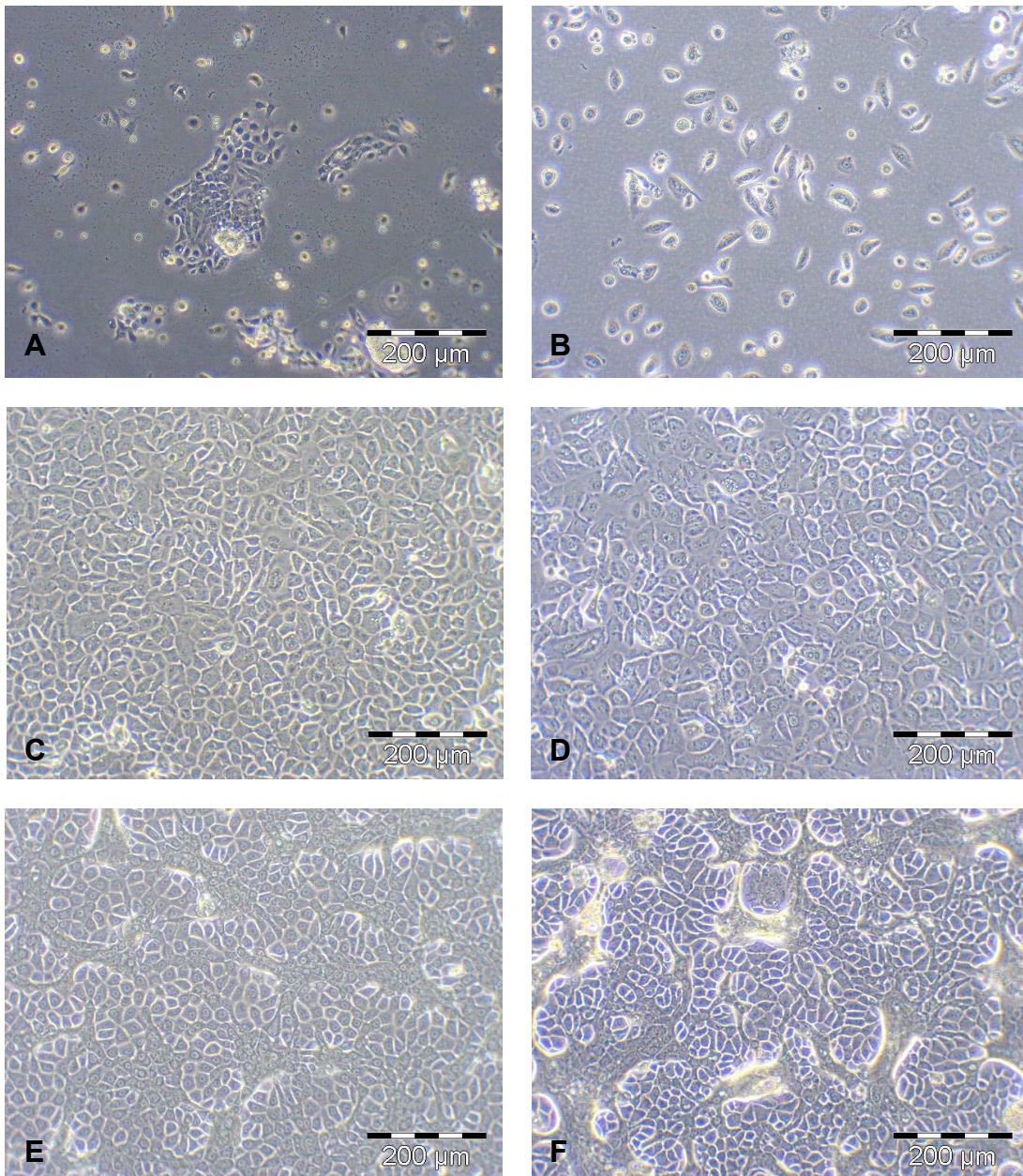


Abb. 16: Wachstumsverhalten der humanen respiratorischen Epithelzellen in der Kultur. Links sind Zellen der P0 und rechts der P1 abgebildet (100 ×): Nach Aussaat adhären die Zellen innerhalb eines Tages (**A, B**), wachsen im Monolayer nach etwa sechs Tagen konfluent (**C, D**) und bilden nach ca. zehn Tagen einen Bilayer (**E, F**). Die Zellen der P0 adhären bevorzugt in Form von Inseln, in denen sich Zilienzellen befinden (**A**). Nach Erreichen der Konfluenz weisen beide Zellkulturen eine charakteristische pflastersteinartige Morphologie auf (**C, D**).

Die humanen respiratorischen Epithelzellen (HRE-Zellen, **Abb. 16**) wachsen zunächst adhären im Monolayer. Die HRE-Zellen aus der Primärkultur (P0) neigen dazu, „Inseln“

zu bilden, d. h. sie adhären und proliferieren bevorzugt als größere Zellaggregate. In der Primärkultur befinden sich Zilienzellen bevorzugt in diesen „Inseln“, während ab der ersten Passage (P1) kaum noch Zilienzellen erkennbar sind. In höheren Passagen bleiben die HRE-Zellen stärker vereinzelt und verteilen sich gleichmäßig auf der Oberfläche des Kulturgefäßes. In Kollagen-A-beschichteten T25-Kulturflaschen erreichen HRE-Zellen aus der P0 nach ca. sechs Tagen Konfluenz, HRE-Zellen aus der P1 nach etwa fünf Tagen. Zellkulturen, die konfluent gewachsen sind, weisen ein typisches pflastersteinartiges Relief auf, da die einzelnen HRE-Zellen eine polygonale Form annehmen. Darüber hinaus wachsen die HRE-Zellen ohne erkennbare Kontaktinhibition in einer zweiten Schicht weiter: So entsteht aus dem Monolayer ein Bilayer. Nicht-adhärenente Zellen wie Erythrozyten werden im Kulturverlauf durch Mediumwechsel ausgewaschen.

3.1.1 Adhärenzverhalten

Direkt nach der Aussaat sind die HRE-Zellen der P1 noch abgerundet. Sie bilden zunächst zytoplasmatische Ausläufer und nehmen mit fortschreitender Adhärenz eine längliche Form an. Mit dem Mikroskop lässt sich erkennen, dass die HRE-Zellen nach 12h auf Kollagen A schon eine längliche Form annehmen, während die HRE-Zellen auf Plastik noch abgerundet sind (**Abb. 17**).

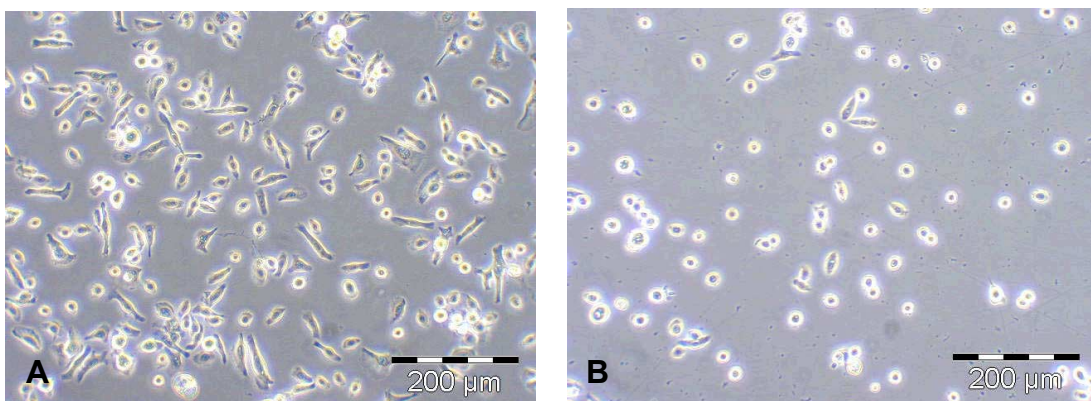


Abb. 17: Vergleich des Adhärenzverhaltens von humanen respiratorischen Epithelzellen der P1 auf Kollagen A und Plastik als Kontrolle (100 ×). Nach 12h haften auf Kollagen A (**A**) mehr Zellen als auf Plastik (**B**). Die Zellen sind bei Aussaat noch abgerundet und nehmen im Lauf der Adhärenz eine längliche Form an.

Der Vergleich der beiden Gruppen Kollagen A und Plastik erfolgt für $n = 5$ Patienten (**Abb. 18**). Die Zelladhärenz nimmt in beiden Gruppen kontinuierlich zu und erreicht ihr Maximum nach 20h. Es zeigt sich, dass zu allen Zeitpunkten auf Kollagen A mehr HRE-Zellen haften als auf Plastik, wobei die restlichen nicht-adhärenenten Zellen vor der Zellzählung ausgewaschen werden. Nach 20h sind 43% der HRE-Zellen auf Kollagen A und 34% auf Plastik adhärenent. Die Differenz zwischen den beiden Gruppen nähert sich somit an. Aber bei Betrachtung des gemittelten Effekts über alle Zeitpunkte ergibt die Varianzanalyse nach Brunner einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,0145$) zwischen den beiden Gruppen.

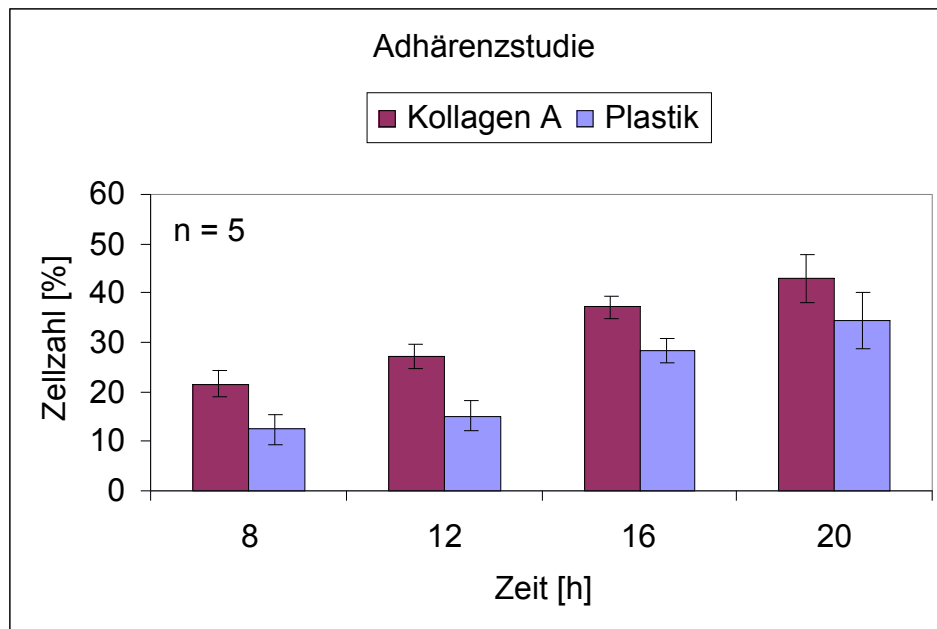


Abb. 18: Vergleich der Adhärenz auf Kollagen A und Plastik. Die Säulen geben den Mittelwert der Zellzahl in Prozent wieder. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Zu allen vier Zeitpunkten haften auf Kollagen A mehr Zellen als in der Kontrollgruppe (Plastik).

3.1.2 Populationsverdoppelungszeit

Für die HRE-Zellen auf Kollagen-A-beschichteten 12-Well-Platten wird der folgende Kulturverlauf beobachtet. In den ersten beiden Tagen scheint die Zelldichte annähernd konstant zu bleiben. Ein deutlicher Anstieg in der Zelldichte lässt sich nach ca. zwei

Tagen verzeichnen. Die Zellkulturen erreichen nach etwa fünf Tagen Konfluenz und wachsen anschließend im Bilayer weiter. Nach einer Woche verlangsamt sich das Wachstum der HRE-Zellen bis die Zellzahl stagniert. Für $n = 3$ Patienten werden die Zellzahlen im Wachstumsverlauf protokolliert und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (**Abb. 19**).

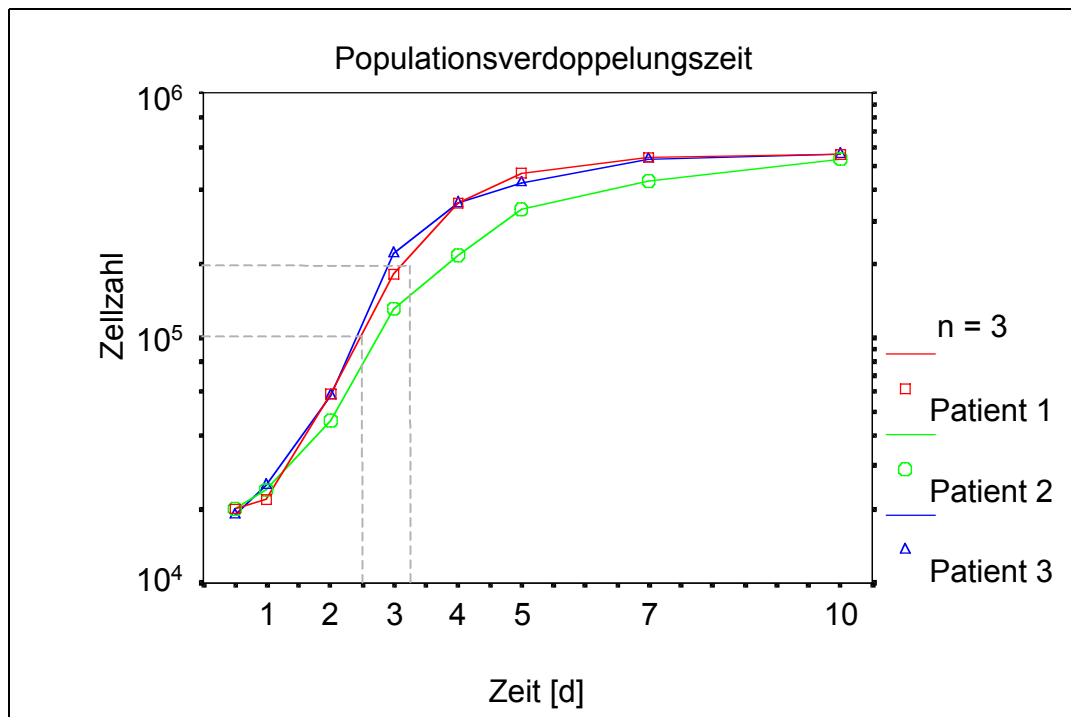


Abb. 19: Grafische Darstellung der Wachstumskurven der humanen respiratorischen Epithelzellen. Die Populationsverdoppelungszeit wird aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase einer Zellpopulation bestimmt. Die gestrichelten Linien zeigen exemplarisch für Patient 1, dass eine Verdoppelung von 10^5 auf 2×10^5 Zellen eine Zeitspanne von ca. 19h in Anspruch nimmt.

Die Populationsverdoppelungszeit (t_{PD}) lässt sich aus dem exponentiellen Wachstumsbereich einer Zellpopulation errechnen, wobei der größte Anstieg der Zellzahl nach rund drei Tagen zu verzeichnen ist. Für $n = 3$ Patienten ergibt sich nach der Formel für t_{PD} ein Wert von $23 \pm 3h$. Alternativ wird die t_{PD} im exponentiellen Wachstumsbereich grafisch bestimmt (**Abb. 19**). Für Patient 1 wird beispielhaft die Verdoppelung von 100.000 auf 200.000 Zellen auf der Ordinate abgetragen. Durch Projektion auf die

Abszisse lässt sich die t_{PD} ablesen, die für Patient 1 etwa 19h beträgt. Für $n = 3$ Patienten ergibt sich nach der grafischen Methode eine t_{PD} von $21 \pm 9h$.

3.1.3 Expansionsstudie

Insgesamt werden $n = 6$ Patienten über mindestens vier Passagen subkultiviert, um das Vermehrungspotential der HRE-Zellen zu untersuchen. Die Zellzahl wird halb-logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (**Abb. 20**).

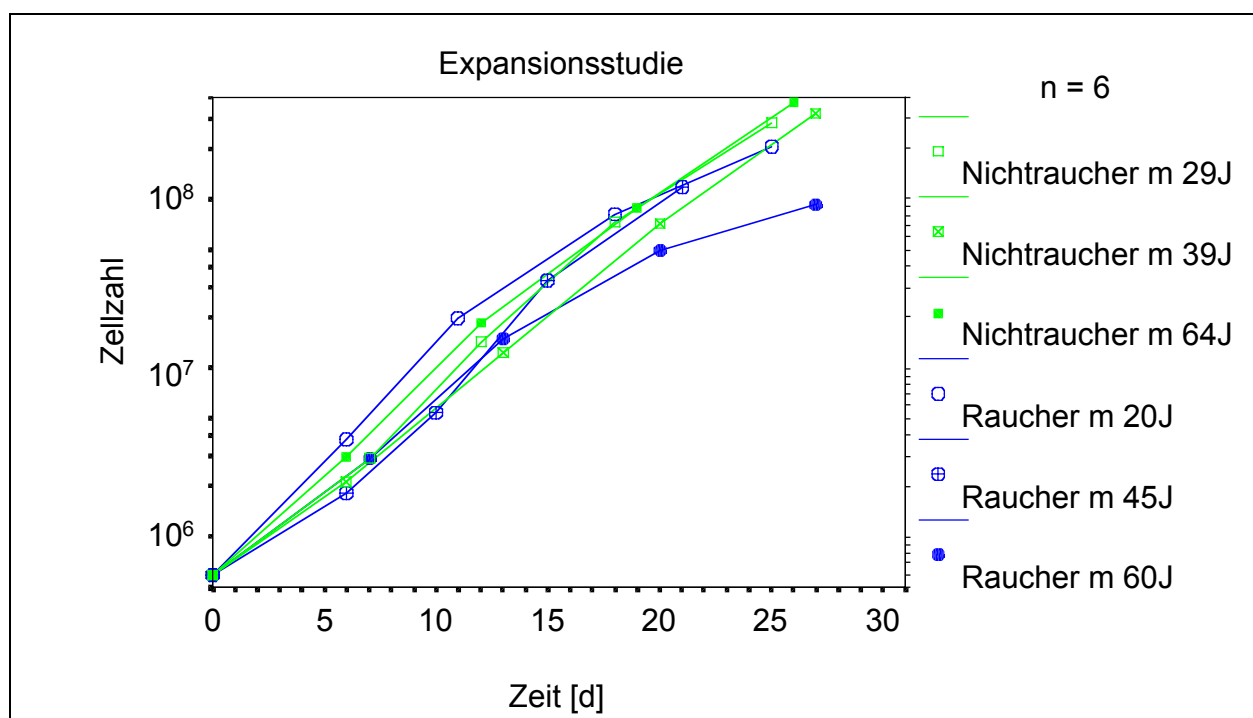


Abb. 20: Vermehrung der humanen respiratorischen Epithelzellen über mehrere Passagen. Innerhalb eines Monats kann die anfängliche Zellzahl durchschnittlich auf das 383fache expandiert werden. Die Faktoren Alter und Rauchen scheinen dabei keinen negativen Einfluss auszuüben.

In den ersten drei Passagen kann jeweils etwa eine Verfünffachung der Zellzahl erreicht werden. Ab der P4 wird durchschnittlich nur noch eine Verdreifachung der Zellzahl erreicht. Die Vitalität liegt bis zur P4 über 80% und fällt in der P5 bis auf 60% ab, sodass von einer weiteren Subkultivierung abgesehen wird. Durch Extrapolation kann

errechnet werden, dass eine Zellexpansion auf durchschnittlich 230 Mio. Zellen möglich ist, was einer 383fachen Vermehrung entspricht. Eine langsamere Proliferation bei Rauchern oder älteren Patienten ist nicht zu beobachten.

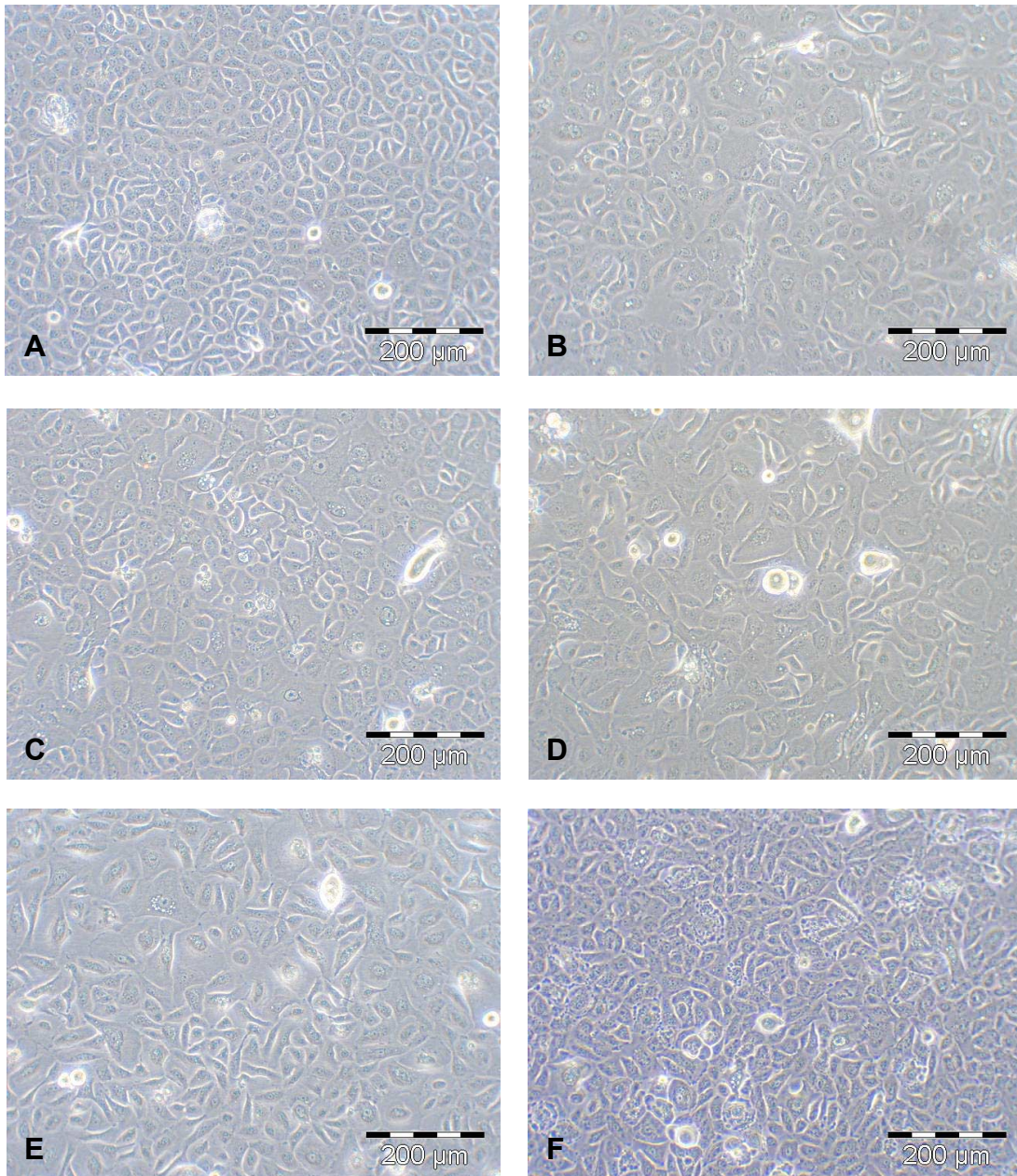


Abb. 21: Morphologie der humanen respiratorischen Epithelzellen über mehrere Passagen (100 ×): P0 (A), P1 (B), P2 (C), P3 (D), P4 (E), P5 (F). In der P0 (A) nehmen die Zellen nach Erreichen der Konfluenz eine polygonale Form an und es entsteht ein kopfsteinpflasterartiges Muster. Der Zelldurchmesser nimmt mit jeder Passage zu, unförmige Zellen tragen in der P5 (F) zu einer heterogenen Morphologie bei.

In der Expansionsstudie wird die Morphologie der HRE-Zellen über mehrere Passagen hinweg beobachtet (**Abb. 21**). Nach Erreichen der Konfluenz nehmen die HRE-Zellen eine polygonale Form an und bilden ein charakteristisches kopfsteinpflasterartiges Muster. Die HRE-Zellen zeigen in der Primärkultur und in den unteren Passagen eine homogene Morphologie. Der Zelldurchmesser nimmt mit jeder Passage kontinuierlich zu. In der P0 beträgt der Zelldurchmesser im Durchschnitt noch 12 μm und in der P1 erreicht er bereits 20 μm . In höheren Passagen tragen unförmige Zellen zu einer heterogenen Morphologie bei.

3.2 Zellmarkerspezifitäten

Alcianblau-Färbung von Becherzellen auf Chamber Slides:

Zur Charakterisierung der HRE-Zellen im Monolayer erfolgt ein semiquantitativer Nachweis von Becherzellen mit der Alcianblau-Färbung über mehrere Passagen. In der P0 sind mehrfach Gruppierungen von Becherzellen anzutreffen. In der P1 finden sich noch vereinzelt Becherzellen. Bereits ab der P2 lassen sie sich nicht mehr nachweisen.

Immunperoxidase-Färbung an Kryoschnitten von nativem Gewebe:

Die Bindungsspezifitäten der monoklonalen Antikörper 34 β E12, CD44S und CD44v6 werden an Kryoschnitten von nativem respiratorischem Gewebe getestet (**Abb. 22**). Die Antigen-positiven Zellen werden durch die Immunperoxidase-Färbung rot gefärbt. Bei Negativkontrollen mit Maus IgG1 ist keine Rotfärbung zu beobachten. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin führt zu einer Blaufärbung der Zellkerne.

Der Nachweis der Zytokeratine CK5/14 erfolgt mit dem monoklonalen AK 34 β E12. Die Färbung fällt für die Basalzellen positiv aus, da bei allen drei Patienten die Basalzellen rot gefärbt sind. Allerdings werden auch die sekretorischen Zellen angefärbt, nämlich die Becherzellen im Epithel und die Drüsen im Bindegewebe. Mit dem AK CD44S werden im Epithel ausschließlich Basalzellen markiert. Unterhalb der Basalmembran werden im Bindegewebe Fibroblasten und Zellen aus der hämatopoetischen Entwicklungsreihe angefärbt. Die Färbung mit AK CD44v6 erfasst nur Basalzellen. Die Zellen im Bindegewebe verhalten sich alle negativ zu AK CD44v6.

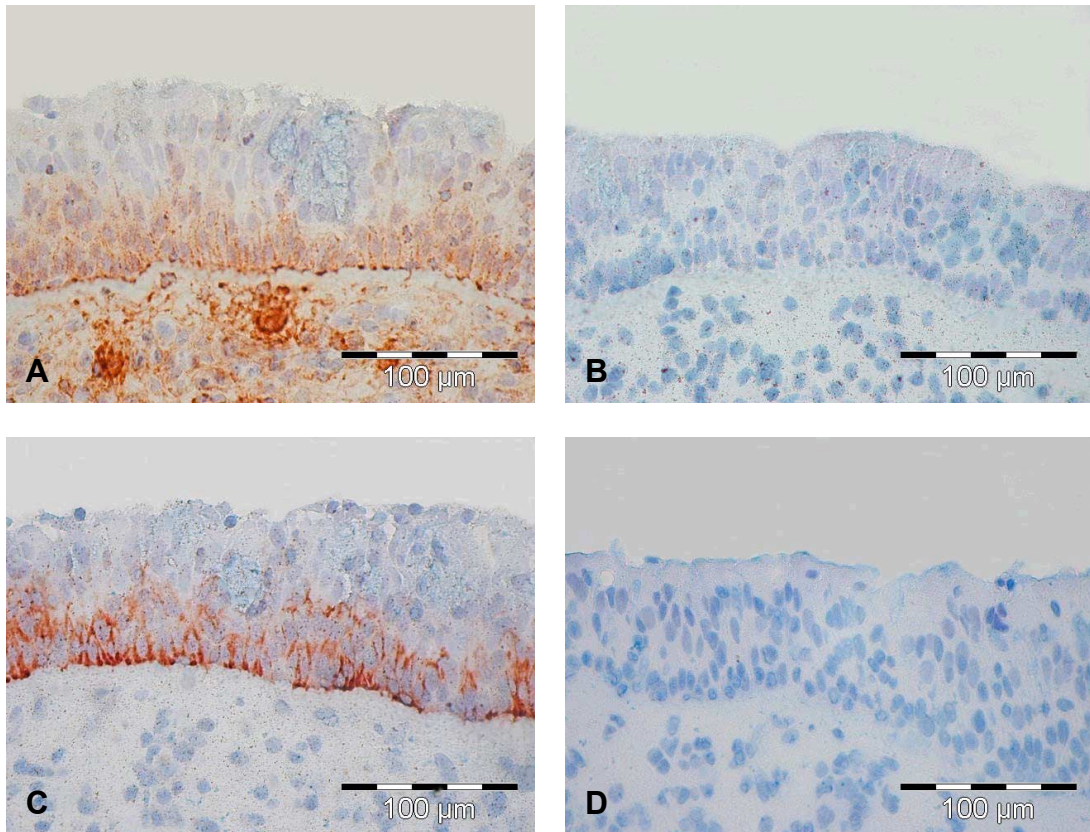


Abb. 22: Immunperoxidase-Färbung an Kryoschnitten von nativem respiratorischem Gewebe (400 ×): Links wird die Färbung mit AK CD44S (**A**), AK CD44v6 (**C**) und rechts die dazugehörigen Negativkontrollen (**B**, **D**) dargestellt. Das Antigen CD44S (**A**) befindet sich auf den Basalzellen und auf Zellen im Bindegewebe, während CD44v6 (**C**) ausschließlich auf den Basalzellen exprimiert wird.

Immunperoxidase-Färbung von Zellkulturen im Air-Liquid-Interface:

Für den Nachweis von Vorläuferzellen in ALI-Kulturen findet eine immunhistochemische Auswertung mit AK 34βE12 und AK CD44v6 statt. Dabei werden die Zellen aus der P0 und der P1 bei Konfluenz, sowie in der P1 acht Tage nach Konfluenz betrachtet.

Bei der Gegenüberstellung des monoklonalen AK 34βE12 und AK CD44v6 fällt auf, dass AK 34βE12 das Zytoplasma der Zellen durch Rotfärbung hervorhebt, während AK CD44v6 die Zellgrenzen betont. Ansonsten zeigen sich beide Antikörper im Färbeverhalten analog, sodass die folgenden Beobachtungen für beide gelten. In Monolayer-Kulturen der P0 und der P1 kommt es bei einem Großteil der Zellen (ca. 2/3) zum Antigennachweis und somit zur Rotfärbung. Nach Erreichen der Konfluenz setzt sich

das Zellwachstum in bestimmten Bereichen im Bilayer fort. Die Zellen im Bilayer lassen sich durch keinen der beiden monoklonalen AK anfärben und erscheinen durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau.

Immunfluoreszenz-Färbung an Kryoschnitten von nativem Gewebe:

Die Zellkerne werden mit Bisbenzimidide (**Abb. 23**) blau gefärbt und sind innerhalb des humanen respiratorischen Epithels palisadenförmig aufgereiht. Die Basalmembran ist als Aussparung zu erkennen. Im Bindegewebe liegen die Zellkerne in diffuser Anordnung.

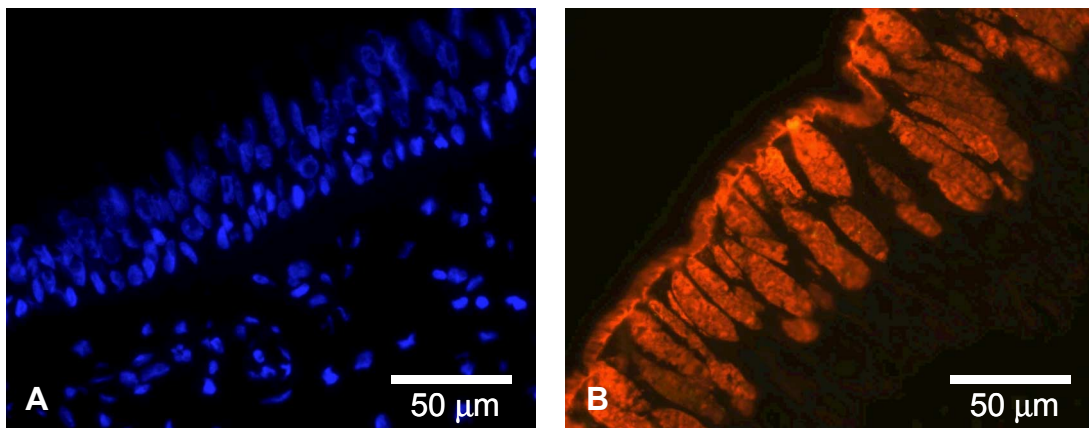


Abb. 23: Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten von nativem respiratorischem Gewebe in Formalin (400 ×). Die Färbung mit Bisbenzimidide (**A**) gibt einen Überblick auf die Anordnung der Zellkerne im respiratorischen Epithel und im Bindegewebe darunter. In Formalin färbt UEA (**B**), neben dem Sekret der Becherzellen, auch die Kinozilien der Zilienzellen auf der Epitheloberfläche an.

UEA-Rhodamine:

Die Präparate, die mit UEA gefärbt werden, erhalten durch Rhodamine eine rote Fluoreszenz. Bei zwei Patienten werden die Becherzellen rot gefärbt, bei einem dritten Patienten ausschließlich die Basalzellen. Nach Fixierung der Präparate in Formalin (**Abb. 23**) werden neben den Becherzellen zusätzlich die Kinozilien auf den hochprismatischen Zilienzellen rot gefärbt.

PNA-Fluoreszein:

Präparate, die mit PNA gefärbt werden, leuchten aufgrund des Farbstoffes Fluoreszein grün. Die Färbung mit PNA führt im humanen respiratorischen Epithel zu einer basalen Akzentuierung. Dabei wird die apikale Seite der Basalmembran angefärbt. Bei zwei Patienten werden die Basalzellen in einer unregelmäßigen Frequenz markiert. Hingegen werden bei einem dritten Patienten keine Basalzellen und dafür einige sekretorische Zellen angefärbt.

GSA-I-B4-FITC:

Die Farbgebung bei GSA (**Abb. 24**) erfolgt mit FITC, einem Fluoreszenzfarbstoff aus dem grünen Spektralbereich. Die Färbung mit GSA-FITC fällt jedoch, abgesehen von unspezifischen Randeffekten, bei allen drei Patienten negativ aus.

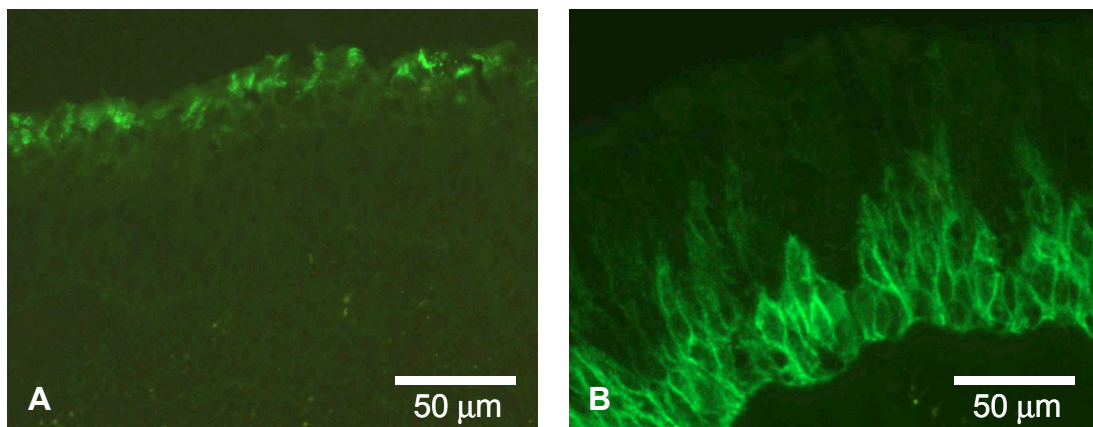


Abb. 24: Immunfluoreszenz-Färbung an Kryoschnitten von nativem respiratorischem Gewebe in Aceton/Methanol (400 ×). Im Vergleich: das Lektin GSA-FITC (**A**) und der monoklonale Antikörper CD44v6-FITC (**B**). Die Färbung mit dem Lektin GSA-FITC (**A**) bleibt negativ und führt lediglich zu unspezifischen Randeffekten. Durch den monoklonalen Antikörper CD44v6-FITC (**B**) werden die Basalzellen spezifisch markiert und stellen sich als kontinuierliche Fluoreszenzbande dar.

CD44v6-FITC:

Bei der Färbung mit dem monoklonalen AK CD44v6-FITC (**Abb. 24**) werden bei allen drei Patienten die Basalzellen angefärbt, aber keine weiteren Zellen im respiratorischen Epithel oder im Bindegewebe. Die Basalzellen erscheinen im gefärbten Präparat als durchgehende Fluoreszenzbande.

3.3 Magnetische Separation von Vorläuferzellen

Dichtezentrifugation mit dem Percoll-Gradienten:

Mit dem Percoll-Gradienten gelingt es, die Erythrozyten, deren Anzahl im Vergleich zu den HRE-Zellen etwa ein Fünffaches beträgt, fast vollständig aus dem Zellgemisch zu depletieren. Durch die Dichtezentrifugation kommt es jedoch insgesamt zu einem Verlust von etwa 1/4 aller HRE-Zellen. Die Vitalität steigt von ca. 80% auf 95% an und zeugt von einer zusätzlichen Depletierung der toten Zellen.

MACS mit dem Lektin GSA-FITC:

Das Lektin GSA-FITC (**Tab. 1**) wird bei fünf Patienten eingesetzt, um die Basalzellen mit magnetischen Partikeln zu konjugieren und anschließend als eigene Population zu separieren. Es zeigt sich jedoch, dass die meisten Zellen aus dem humanen respiratorischen Epithel negativ für dieses Epitop sind und die positive Fraktion nicht mehr als 5% erreicht. Die GSA-positiven Zellen werden mit Farbstoff Fluoreszein markiert und leuchten deshalb grün. Allerdings entwickeln die positiven Zellen in dieser Versuchsreihe weder im Fluoreszenzmikroskop noch im FACS ein hinreichend starkes Fluoreszenz-Signal, das eine Quantifizierung der positiven Zellen einwandfrei ermöglichen würde. Selbst die Titration des Lektins GSA-FITC mit Konzentration bis zu 40 µg/ml und Kontrollen ohne Anti-FITC-Microbeads führen nicht zu einer eindeutig positiven Färbung.

MACS mit dem monoklonalen Antikörper CD44S:

Die Separation von Zellen, die positiv für das Epitop CD44S (**Tab. 1**) sind, ergibt eine Fraktion von 11%. Hingegen führen Kontrollen ohne primären Antikörper nur zu einer Fraktion von ca. 2%. Zur besseren Vergleichbarkeit von verschiedenen MACS-Läufen wird die positive Fraktion auf alle zurückgewonnenen Zellen (positive und negative Fraktion) bezogen und dann als Ausbeute von positiven Zellen angegeben, die in diesem Fall 20% beträgt. Die monoklonalen Antikörper gegen das Epitop CD44S markieren, neben den Basalzellen, auch die Erythrozyten. Diese bewirken, wenn sie nicht depletiert werden, eine Rotfärbung des Primärisolats, das mittels MACS in eine klarsichtige negative Fraktion ohne Erythrozyten und eine rötliche positive Fraktion mit Erythrozyten separiert wird.

Tab. 1: Magnetische Separation zur Anreicherung von Vorläuferzellen

	GSA-FITC (n = 5)	CD44S (n = 3)	CD44v6 (n = 5)
Ungefärbte Originalfraktion	100%	100%	100%
Gefärbte Originalfraktion	keine Angaben	74%	63%
Negative Fraktion (NF)	48%	45%	41%
Positive Fraktion (PF)	5%	11%	10%
Rückgewinnung = PF + NF	53%	56%	51%
Ausbeute = PF/(PF + NF)	9%	20%	20%

Der methodische Fehler für die positive Fraktion beträgt mindestens 2%. Dieser Fehler wird ermittelt, indem ungefärbte Zellen, nur mit Microbeads inkubiert, über die Trennsäule gegeben werden. Die Rückgewinnung liegt bei über 50%, d. h. im Rahmen der magnetischen Separation werden von der ursprünglichen Zellsuspension (ungefärbte Originalfraktion) mehr als 50% der Zellen zusammen in der negativen und positiven Fraktion wiedergewonnen. Die restlichen Zellen gehen während der Waschschrte bei der magnetischen Markierung und durch die Filtration der Zellsuspension vor der Trennsäule verloren.

MACS mit dem monoklonalen Antikörper CD44v6:

Für $n = 5$ Patienten wird eine magnetische Separation mit dem monoklonalen AK CD44v6 (**Tab. 1**) vorgenommen. Nach Depletierung der Erythrozyten entsteht ein Gemisch aus HRE-Zellen (ungefärbte Originalfraktion), aus dem standardisiert 5 Mio. Zellen (100%) zur weiteren Verarbeitung entnommen werden. Es folgt die Markierung mit AK CD44v6 und die Kopplung mit den magnetischen Partikeln. Durch die hierfür notwendigen Waschschriffe kommt es zu einem Zellverlust von ca. 1/3. Die markierte Zellsuspension wird nun als gefärbte Originalfraktion (63%) auf die Trennsäule im Magnetfeld gegeben. Der Durchlauf bildet die negative Fraktion (41%). Außerhalb des Magnetfeldes wird anschließend die positive Fraktion (10%) durch Eluieren gewonnen und ergibt, bezogen auf alle zurückgewonnenen Zellen (51%), eine 20%ige Ausbeute von CD44v6 positiven Zellen.

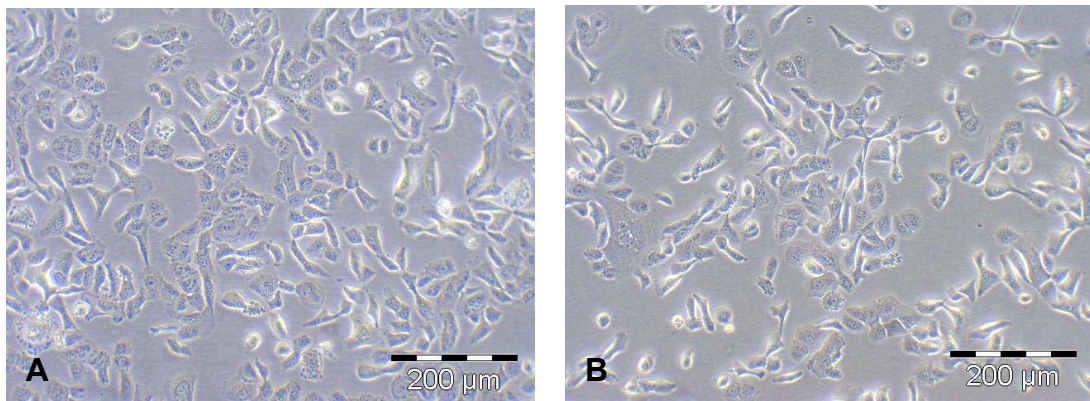


Abb. 25: Kultivierung der verschiedenen Populationen nach MACS (100 ×). Die Zellen aus der positiven Fraktion (**A**) und aus der negativen Fraktion (**B**) zeigen adäquates Proliferationsverhalten. Nach vier Tagen in der Kultur unterscheidet sich die Morphologie der beiden Populationen nur unwesentlich.

Nach der magnetischen Separation werden die Zellen aus den vier Fraktionen in Kollagen-A-beschichteten T25-Kulturflaschen eine Woche erfolgreich kultiviert und einmal passagiert (**Abb. 25**). Im Vergleich zur ungefärbten Originalfraktion zeigen die Zellen aus den anderen drei Fraktionen (gefärbte Originalfraktion, negative und positive

Fraktion) initial eine verminderte Adhärenz und eine geringere Proliferation. Nach einer Passage gleichen sich die Unterschiede im Adhärenz- und Proliferationsverhalten bei allen Fraktionen an.

MACS von Vorläuferzellen aus Primärkultur:

Die primären HRE-Zellen werden bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert, durch Trypsinierung wieder gelöst und anschließend magnetisch separiert. Zur Nutzung eines Percoll-Gradienten besteht keine Notwendigkeit, da die Erythrozyten bereits durch Mediumwechsel ausgewaschen sind. Die Vitalität der HRE-Zellen liegt bei ca. 90%. Der durchschnittliche Zelldurchmesser der P1 beträgt 20 μm und stellt kein Hindernis für das Passieren der Zellen durch Vorfilter und Trennsäule dar. Die magnetische Zellseparation wird für die primären Marker GSA-FITC, AK CD44S und AK CD44v6 vorgenommen. Als Resultat werden für GSA-FITC und AK CD44v6 weniger als 10% Ausbeute erzielt. Die Separation mit AK CD44S führt zu einer wesentlich höheren Ausbeute von 35%.

Analyse der magnetischen Separation mit dem Durchflusszytometer:

Im Anschluss an die magnetische Separation werden die folgenden vier Fraktionen im FACS analysiert: ungefärbte Originalfraktion, gefärbte Originalfraktion, negative Fraktion und positive Fraktion (**Abb. 26**).

Die Vitalität entspricht dem Anteil der PI-negativen Zellen ($\text{PI} < 10^2$) und beträgt für die ungefärbte Originalfraktion noch 79%, für die gefärbte Originalfraktion 64%, für die negative Fraktion 68% und für die positive Fraktion nur 58%. Die restlichen Zellen sind PI-positiv ($\text{PI} > 10^2$) und werden als tote Zelle betrachtet. Im Hinblick auf CD44v6-FITC ergeben sich zwischen der ungefärbten Originalfraktion als Kontrolle und den übrigen drei Fraktionen (gefärbte Originalfraktion, negative und positive Fraktion) keine eindeutigen Unterschiede. Die ungefärbte Originalfraktion liefert den Referenzwert für CD44v6-FITC-negative Zellen ($\text{FITC} < 10^2$), da nur die Eigenfluoreszenz der Zellen gemessen wird. Die übrigen drei Fraktionen enthalten keine eindeutig CD44v6-FITC-positiven Zellen ($\text{FITC} > 10^2$). Lediglich in der positiven Fraktion kommt es bezüglich des Parameters FITC, verglichen mit der negativen Fraktion, zu einer graduellen

Rechtsverschiebung. Selbst nach Austitrieren des Primärantikörpers AK CD44v6-FITC mit Konzentrationen von 0,5 bis 5 µg/ml und in Kontrollen ohne Anti-FITC-Microbeads lässt sich keine eindeutig positive Färbung nachweisen.

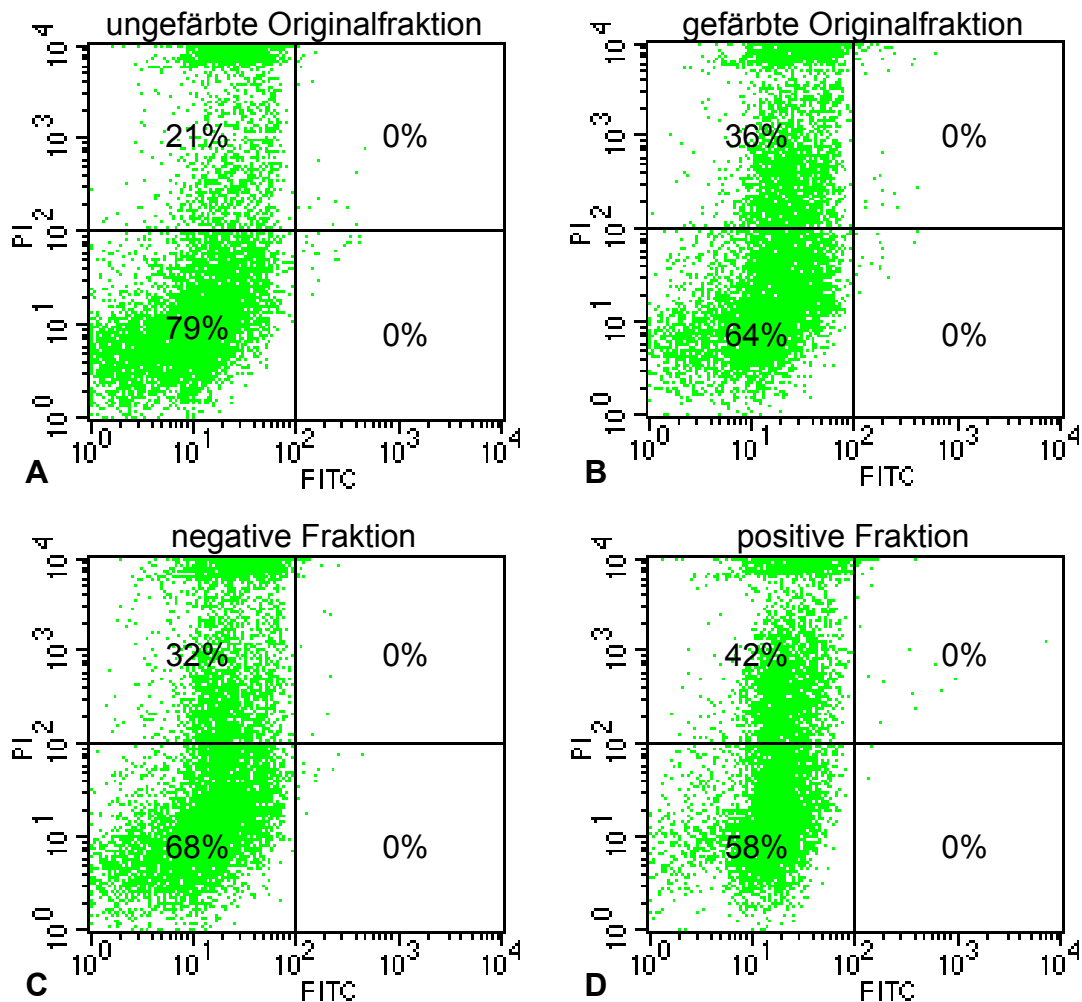


Abb. 26: FACS-Analyse der magnetischen Separation mit dem monoklonalen Antikörper CD44v6-FITC und Anti-FITC-Microbeads: ungefärbte Originalfraktion (**A**), gefärbte Originalfraktion (**B**), negative Fraktion (**C**), positive Fraktion (**D**). Zwischen der negativen Fraktion (**C**) und der positiven Fraktion (**D**) lässt sich nur eine graduelle Rechtsverschiebung beobachten. Die Vitalität entspricht dem Anteil der PI-negativen Zellen und liegt bei der ungefärbten Originalfraktion (**A**) noch bei 79% und fällt in der positiven Fraktion (**D**) auf 58% ab.

4 Diskussion

Die Ziele der vorliegenden Arbeit beinhalten die Isolierung von vitalen humanen respiratorischen Epithelzellen (HRE-Zellen) und ihre Kultivierung, wobei typische morphologische Eigenschaften beibehalten werden. Erstmals soll eine Methode etabliert werden, die eine magnetische Separation von Vorläuferzellen aus dem humanen respiratorischen Epithel gewährleistet. Auf der Ebene von nativen Basalzellen und in Epithelzelmischkulturen gelingt der Nachweis von CD44v6-positiven Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, dass Vorläuferzellen des humanen respiratorischen Epithels das Potenzial zur Epithelisierung der Trachea besitzen.

4.1 Isolierung und Kultivierung

Die Isolierung der HRE-Zellen soll eine möglichst hohe Zellanzahl ergeben und dabei eine Kontamination durch andere Zellen wie z. B. Fibroblasten weitgehend vermeiden. Bei den primär isolierten HRE-Zellen handelt es sich stets um ein Gemisch aus Basalzellen, Becherzellen und Zilienzellen [56]. Mittels schonender Präparation wird die Basalmembran als natürliche Barriere zwischen Epithel und Bindegewebe erhalten, was eine Kontamination durch Fibroblasten nahezu verhindert.

Mikroskopisch lassen sich HRE-Zellen und Erythrozyten unterscheiden: Erythrozyten sind kernlos und haben mit 7,5 µm einen kleineren mittleren Durchmesser [5]. Eine eindeutige Identifizierung im Hämozytometer gestaltet sich jedoch im Einzelfall schwierig. Deshalb ist die Zellzahlbestimmung der HRE-Zellen im Primärisolat mit einer Unschärfe behaftet, die zu einer Fehlerquote von mindestens 10% führt [54]. Die selektive Lyse der Erythrozyten mit 1%iger Essigsäure erleichtert die Zählung der verbleibenden HRE-Zellen. Dabei variiert die benötigte Einwirkzeit abhängig von der osmotischen Resistenz der Erythrozyten. Die Vitalität der primär isolierten HRE-Zellen liegt deutlich über 80% und genügt damit den Anforderungen für eine anschließende Kultivierung [57].

Die Kultivierung mit serumfreiem AECG-Medium begünstigt die Proliferation der HRE-Zellen [58]. Eine Vermehrung von Fibroblasten wird hingegen nicht unterstützt [27]. Dies bestärkt die Annahme, dass ein Großteil der kultivierten Zellen epithelialen Ursprungs ist. Wie in der Literatur beschrieben, erreichen die HRE-Zellkulturen auf Kollagen nach einem Wachstum von ca. sechs Tagen im Monolayer die Konfluenz [59].

In der vorliegenden Arbeit nehmen die HRE-Zellen nach Erreichen der Konfluenz eine polygonale Form an und erzeugen dadurch ein pflastersteinartiges Muster, was mit Angaben aus der Literatur konform ist [60, 61]. Dies zeigt, dass der Zell-zu-Zell-Kontakt einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie ausübt.

4.1.1 Adhärenzverhalten

Bei Betrachtung des Adhärenzverhaltens der HRE-Zellen ergeben sich zwei relevante Aspekte. Erstens stellt die Fähigkeit zur Adhärenz eine notwendige Voraussetzung zur Proliferation dar, weil eine Vermehrung von HRE-Zellen in Suspensionskulturen nicht stattfindet [62]. Zweitens ergibt sich durch die Tatsache, dass nicht alle Zellen aus dem Zellgemisch die Fähigkeit zur Adhärenz besitzen, zwangsläufig eine Selektion [47].

Basalzellen und Becherzellen gehören zu den Zellen, die adhären können [63]. Zilienzellen besitzen jedoch aufgrund ihrer Eigenbewegung eine eingeschränkte Fähigkeit zur Adhärenz [63]. Sie neigen dazu, freiflottierende Sphäroide zu bilden [64]. In Zellaggregaten können sie allerdings infolge des bedingten Zellkontaktes durchaus adhären.

Einen wichtigen Faktor für die Adhärenz stellt die Oberflächenbeschaffenheit des Kulturgefäßes dar. Im Vergleich zwischen unbeschichteten und Kollagen-A-beschichteten Polystyrol-Kulturgefäßen zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit $p \leq 0,0145$ zugunsten der Adhärenz auf Kollagen A. Laut Angaben des Herstellers Biochrom AG besteht Kollagen A zu 95% aus Kollagen Typ I und zu 5% aus Kollagen Typ IV. Als integralen Bestandteil enthält die Basalmembran in vivo Kollagen Typ IV [5]. Deshalb kann mit Kollagen A in vitro die Matrix der Basalmembran simuliert werden, um so das Adhärenzverhalten der HRE-Zellen zu begünstigen.

Die Adhärenzstudie belegt, dass die Anzahl der adhären HRE-Zellen stetig zunimmt und auf Kollagen A nach 20h ein Maximum von 43% erreicht. Eine vollständige Adhärenz aller Zellen aus dem Zellgemisch ist nicht zu erwarten, da überwiegend vitale Basal- und Becherzellen adhären [63]. In der Literatur wird eine Steigerung der Adhärenz von respiratorischen Epithelzellen der Ratte durch Vorbehandlung der Kulturoberfläche mit Kollagen beschrieben [27]. Für die HRE-Zellen wird ebenfalls gezeigt, dass die Adhärenz auf Kollagen A bereits nach 12h, jedoch auf Plastik erst nach 16h

weitgehend abgeschlossen ist. In weiterer Konsequenz wird durch eine frühzeitige Adhärenz die Progression der Proliferation begünstigt [65].

4.1.2 Proliferationsverhalten

Die Zellproliferation lässt sich prinzipiell in die drei Stadien Lag-, Log- und Plateau-Phase gliedern [53]. Die Proliferation der HRE-Zellen nimmt folgenden Verlauf: In der Lag-Phase erfolgt die Anpassung der HRE-Zellen an die Kulturbedingungen. Sie währt ungefähr einen Tag und es findet keine relevante Zellvermehrung statt. Danach setzt in der Log-Phase die Zellvermehrung ein, in der die Anzahl der HRE-Zellen ungefähr bis zum fünften Tag exponentiell zunimmt. Nach rund einer Woche schließt sich die Plateau-Phase an, in der sich das Zellwachstum verlangsamt. Die Proliferation der HRE-Zellen nimmt etwa zeitgleich mit Erreichen der Konfluenz ab. Eine Kontaktinhibition ist jedoch nicht erkennbar, da sich das Wachstum im Bilayer fortsetzt.

Für die Herstellung eines epithelisierten Trachealersatzes ist es von Bedeutung, innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl von vitalen HRE-Zellen zu erzeugen. Zur Charakterisierung der Proliferationskinetik eignet sich die Populationsverdoppelungszeit (t_{PD}). Sie benennt die benötigte Zeit, um innerhalb exponentiellen Wachstums die Zellzahl zu verdoppeln [53]. In der Literatur wird für die HRE-Zellen aus nasalen Polypen eine $t_{PD} = 36h$ beschrieben [66]. In der vorliegenden Arbeit wird für die t_{PD} der HRE-Zellen aus den Conchae nasales inferiores ein Mittelwert von 23h errechnet. Bei der Beurteilung der t_{PD} muss jedoch beachtet werden, dass sie von Faktoren wie Aussaatdichte (hier 12.000 Zellen/cm²) und Beschichtung der Kulturoberfläche (hier Kollagen A) abhängig ist.

In der Expansionsstudie wird die Proliferationskapazität der HRE-Zellen über vier Passagen verfolgt. Bei den sechs Patienten ergeben sich hinsichtlich der Proliferation keine offensichtlichen Unterschiede aufgrund der Faktoren Alter oder Rauchen. Ab der P4 lässt sich bei allen HRE-Zellkulturen eine Verlangsamung der Proliferation verzeichnen. Eine weitere Subkultivierung wäre zwar möglich, sollte aber aufgrund von morphologischer Degeneration, sinkender Vitalität und vermindertem Differenzierungspotenzial nicht forciert werden.

Eine Trachea mit beispielsweise einer Länge von 14 cm und einem Durchmesser von 2,7 cm besitzt eine Oberfläche von ca. 119 cm² [4]. Zur vollständigen Epithelisierung der Trachea im Monolayer würden etwa 38 Mio. HRE-Zellen benötigt, wenn von einem durchschnittlichen Zelldurchmesser von 20 µm ausgegangen wird. Die Expansionsstudie zeigt, dass innerhalb von vier Passagen eine Zellvermehrung um den Faktor 383 möglich ist. Aus einem Nasenmuschelpaar werden durchschnittlich 7,1 Mio. HRE-Zellen gewonnen. Bei Kultivierung aller HRE-Zellen kann eine theoretische Gesamtzellzahl von ca. 2,7 Milliarden erreicht werden. Damit würde die geforderte Zellzahl weit übertroffen und sogar für eine Epithelisierung der Trachea im Multilayer ausreichen. Die Proliferationskapazität muss aber vor dem Hintergrund eines intakten Differenzierungspotenzials, das nicht Gegenstand der Untersuchung ist, bewertet werden [67]. Letztendlich können nur differenzierte HRE-Zellen ein funktionelles respiratorisches Epithel ausbilden, sodass eine epitheliale Barriere entsteht und die mukoziliäre Clearance gewährleistet ist [39].

4.1.3 Differenzierung im Air-Liquid-Interface

Allgemein gilt für die Zellbiologie die Prämisse, dass Zellen zwei konträre Funktionszustände annehmen können: Sie können entweder proliferieren oder sich differenzieren, aber nicht beides gleichzeitig [68].

Zur vollständigen Funktionalität des respiratorischen Epithels gehört die mukoziliäre Clearance [39]. Ein wesentlicher Bestandteil von ihr ist der koordinierte Flimmerschlag der kinezilientragenden Zellen in Richtung des Pharynx [5]. Bei der konventionellen Kultivierung der HRE-Zellen kommt es zu einer Dedifferenzierung [39]. Typische Merkmale wie Zilienbesatz und Sekretion von Muzinen sind bereits nach einer Passage regredient.

Um das Milieu der Trachea in vitro nachzuempfinden, ist eine Kultivierung basierend auf dem Prinzip des Air-Liquid-Interfaces (ALI) geeignet [67]. Die Zellen befinden sich auf einer Kollagenmembran und erhalten eine Polarität, indem sie von der basalen Seite mit Medium unterspült und auf der apikalen Seite der gasförmigen Phase exponiert werden [69]. Dies birgt die Gefahr, dass mit Fortschreiten der Zellproliferation im Multilayer die Diffusionsstrecke für das Nährmedium zu groß wird, sodass die oberen Zellen

dehydrieren. Die Methode des ALI stabilisiert die Zilienexprimierung und soll die Differenzierung von Vorläuferzellen zu zilienbildenden Zellen fördern [67].

Die immunhistochemische Charakterisierung der ALI-Kulturen gibt indirekt Aufschluss über das Differenzierungsverhalten der HRE-Zellen. Die eingesetzten Basalzellmarker AK CD44v6 und AK 34 β E12 verhalten sich im Verteilungsmuster ihrer Anfärbung analog und können gemeinsam diskutiert werden. Nach Erreichen der Konfluenz findet eine Exponierung der HRE-Zellen im ALI gegenüber der gasförmigen Phase statt, um eine Differenzierung zu induzieren. Die Monolayer-Kulturen der P0 und der P1 setzen sich größtenteils aus Antigen-positiven Zellen zusammen. Bei den positiv angefärbten HRE-Zellen handelt es sich folglich um Vorläuferzellen, wobei die Zulässigkeit einer Aufschlüsselung in Basalzellen und dedifferenzierte sekretorische Zellen unklar bleibt [26, 70].

Die Entwicklung der ALI-Kulturen setzt sich dergestalt fort, dass die Proliferation in den Bilayer übergeht. Sukzessive wird die erste Schicht von Vorläuferzellen von einer zweiten Zellschicht überzogen. Die Zellen des Bilayers erweisen sich als Antigen-negativ für AK 34 β E12 sowie AK CD44v6. Das Färbeverhalten deutet darauf hin, dass es sich bei den Zellen im Bilayer nicht um Basalzellen, sondern möglicherweise um differenzierte Zellen handelt. Zur Bestätigung müssten die differenzierten Zellen immunhistochemisch identifiziert werden: Für die Detektion von Zilienzellen wird in der Literatur der AK 5B4/H3 beschrieben, der die Zilienzellen des Hasen auch unabhängig vom Zilienbesatz extrazellulär markieren kann [71]. Die humanen Becherzellen lassen sich durch AK HCS 18 detektieren, der spezifisch an intrazelluläre Muzine bindet [72].

4.2 Zellmarker für das humane respiratorische Epithel

Zellmarker sind unter zwei Aspekten von großer Bedeutung. Auf der einen Seite ist es nützlich, Marker zu finden, die die Identifizierung von Zelltypen aus dem humanen respiratorischen Epithel erlauben. Der zweite Aspekt ist die Eignung des Zellmarkers für eine Separation. Die Tauglichkeit eines Markers für die Separation mittels MACS hängt von zwei Hauptkriterien ab: Der Marker muss für die Zielzelle eine hohe Spezifität aufweisen und das Antigen sollte extrazellulär lokalisiert sein, um die Konjugation mit den Magnetpartikeln zu ermöglichen [50].

4.2.1 Alcianblau-Färbung

Mit der Alcianblau-Färbung erfolgt der histologische Nachweis von sauren Proteoglykanen der Becherzellen [5]. Bei der Anfärbung von HRE-Zellen im Monolayer auf Chamber-Slides fällt auf, dass die Anzahl der muzin-produzierenden Becherzellen mit jeder Passage kontinuierlich abnimmt. Bereits nach zwei Passagen lassen sich keine blau gefärbten Zellen mehr nachweisen. Die Becherzellen gelten als teilungsfähig, sie dedifferenzieren jedoch während der Kultivierung [22]. Die Abnahme der Sekretion von Muzinen ist also nicht zwangsläufig mit der Abnahme von sekretorischen Zellen als Ganzes gleichzusetzen, sondern kann auch auf eine Dedifferenzierung von Becherzellen zurückgeführt werden. Zur Identifikation der Becherzellen in Zellkulturen wäre folglich ein sekretunabhängiger Marker ideal wie z. B. das Lektin HPA-gp120, das sekretorische Zellen im respiratorischen Epithel des Hamsters unabhängig vom Muzin-gehalt bindet [73].

Tab. 2: Zellmarker für das humane respiratorische Epithel. Für jede Färbemethode werden n = 3 Patienten aufgeführt.

n = 3	Zilienzellen	Becherzellen	Basalzellen
GSA	0	0	0
UEA in Formalin	+++	+++	0
UEA	0	++	+
PNA	0	+	++
34βE12	0	+++	+++
CD44S	0	0	+++
CD44v6	0	0	+++

+, ++, +++: Anzahl der Patienten mit positivem Nachweis, 0: kein Nachweis

4.2.2 Lektine

Eine gängige Methode zur immunhistochemischen Charakterisierung des respiratorischen Epithels besteht in der Verwendung von Lektinen. Bei den Lektinen handelt es sich um Proteine, die meist aus Pflanzen stammen und mit bestimmten Kohlenhydraten reagieren [43].

UEA (**Tab. 2**) färbt bei zwei Patienten die Becherzellen an. In einem Fall kommt es jedoch zum alleinigen Nachweis von Basalzellen. Nach vorheriger Fixierung in Formalin werden neben den Becherzellen auch die Kinozilien auf den hochprismatischen Zilienzellen angefärbt. Es ist bekannt, dass Formalin zu einer Quervernetzung der Proteine führt [5]. Außerdem färbt UEA die Glykokalyx auf der Epitheloberfläche an [27]. Eine spezifische Markierung der Kinozilien lässt sich dadurch aber nicht hinreichend erklären. In der Literatur wird beschrieben, dass der Nachweis mit UEA nur für Sekretoren, aber unabhängig von der jeweiligen Blutgruppe gelingt [74]. Allerdings kommt es bei Patienten mit der Blutgruppe 0 zu einer verstärkten Anfärbung der Basalzellen [74].

PNA (**Tab. 2**) tendiert zu einer Färbung einzelner Basalzellen sowie der apikalen Seite der Basalmembran. Bei einem Patienten kommt es jedoch ausschließlich zur Markierung von sekretorischen Zellen. Ein Grund für das Nichtanfärben der Basalzellen durch PNA kann die Maskierung der terminalen Galaktose durch Neuraminsäure sein [75]. Eine Färbung der Basalzellen mit PNA zeigt weder eine Abhängigkeit vom ABO-Blutgruppensystem noch vom Sekretor-Status [74].

GSA wird in der Literatur als ein spezifischer Marker für Basalzellen beschrieben [27, 76]. In der vorliegenden Arbeit fällt die Färbung mit GSA (**Tab. 2**) jedoch bei allen drei Patienten negativ aus. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass nur Sekretoren mit der Blutgruppe B und AB das Antigen für GSA besitzen [74]. Außerdem beruht der Nachweis der Spezifität von GSA für Basalzellen vor allem auf der Testung bei Ratten, weshalb eine Übertragbarkeit der Spezifität auf den Menschen umstritten ist [44].

Insgesamt scheint das Färbeverhalten der Lektine von interindividuellen Unterschieden und Blutgruppenzugehörigkeit dominiert zu werden. Deshalb genügen die Lektine nicht dem Anspruch, einzelne Zelltypen aus dem humanen respiratorischen Epithel spezifisch nachzuweisen oder zu separieren.

4.2.3 Monoklonale Antikörper

Antikörper gegen die Zytokeratine CK5/14 gelten als Standard für den Nachweis von Basalzellen [77]. Als intermediäre Filamente sind die Zytokeratine ein Teil des Zytoskeletts der Zellen [78].

Der Nachweis der Basalzellen mit dem intrazellulären AK 34 β E12 (**Tab. 2**) gelingt bei allen Patienten. Zusätzlich werden aber auch die Becherzellen und die seromukösen Drüsenpakete im Bindegewebe angefärbt. Die Färbung der sekretorischen Zellen erscheint zuerst unerwartet, da AK 34 β E12 als ein spezifischer Basalzellenmarker beschrieben wird [28]. Neben CK5/14 liegen jedoch auch die Zytokeratine CK1/10 im Spektrum von AK 34 β E12, was zu einer Färbung der sekretorischen Zellen führt [79].

Das oberflächliche Epitop CD44 ist als Adhäsionsmolekül bekannt und bindet spezifisch an Hyaluronsäure [80]. Es kann zwischen einer Standardform CD44S und zehn variablen Isoformen CD44v1 bis CD44v10 unterschieden werden [45]. Die ubiquitäre Standardform CD44S kann laut Angaben des Herstellers Dako auf folgenden Zellen nachgewiesen werden: Leukozyten und Erythrozyten aus der hämatopoetischen Entwicklungsreihe, Fibroblasten im Bindegewebe und Basalzellen im Epithel. Die variablen Isoformen von CD44 gelten als epithelrestriktiv; besonders hervorzuheben sind CD44v6 und CD44v9 als spezifische Marker für Basalzellen [46]. Bisher wird der Nachweis von Basalzellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD44v6 im humanen bronchialen Epithel beschrieben [81]. In der vorliegenden Arbeit werden Basalzellen aus dem oberen Respirationstrakt mit monoklonalen AK gegen CD44v6 (**Tab. 2**) nachgewiesen. Der Nachweis des Antigens CD44v6 auf Basalzellen gelingt an nativen Kryoschnitten der Conchae nasales inferiores bei drei verschiedenen Patienten, und zwar sowohl durch Immunperoxidase-Färbung, als auch durch Immunfluoreszenzfärbung. In den ALI-Kulturen von primären und subkultivierten HRE-Zellen werden die Vorläuferzellen, die sich in der unteren Zellschicht unmittelbar auf der Kollagenmatrix befinden, mit AK CD44v6 angefärbt, während die Zellen in der oberen Zellschicht ungefärbt bleiben. Vorangegangene Studien von anderen Arbeitsgruppen zeigen sogar eine erhöhte Exprimierung von CD44v6 auf regenerativen Zellen z. B. nach Epithelzellverlust bei Asthma bronchiale [82]. Eine verstärkte Exprimierung von CD44v6 wird auch in vitro nach mechanischer Schädigung von Epithelzellkulturen beobachtet [83].

Bei der Färbung der ALI-Kulturen mit AK CD44v6 und AK 34 β E12 lässt sich demonstrieren, dass die entsprechenden Antigene an unterschiedlichen Zellorten lokalisiert sind. Die markante Akzentuierung der Zytoplasmamembran bestätigt, dass es sich bei CD44v6 um ein extrazelluläres Antigen handelt [45]. Hingegen wird mit AK 34 β E12 verstärkt das intrazelluläre Zytoplasma angefärbt, die Zytoplasmamembran jedoch ausgespart [79].

Der extrazelluläre Bindungsort und die Spezifität für Basalzellen offerieren, dass der monoklonale AK CD44v6 ein spezifischer Marker zur Identifizierung und zur Separation von Basalzellen aus dem humanen respiratorischen Epithel ist.

4.3 Magnetische Separation von Vorläuferzellen

Durch magnetische Separation (MACS) soll aus dem humanen respiratorischen Epithel eine Population von Vorläuferzellen angereichert werden. Als Vorläuferzelle verfügt die Basalzelle über das Potenzial zur Proliferation und zur Differenzierung [84]. Deshalb besitzen die Basalzellen die Fähigkeit zur Restitutio ad integrum, also zur vollständigen Wiederherstellung, des respiratorischen Epithels [85]. Durch die Anreicherung einer reinen Basalzellenpopulation eröffnen sich molekularbiologische Analysemöglichkeiten für chronische Atemwegsentzündungen, die Tumorgenese und die Gentherapie [25].

MACS und FACS mit GSA-FITC:

In vorangegangenen Studien wird demonstriert, dass Basalzellen aus dem respiratorischen Epithel der Ratte erfolgreich mittels FACS angereichert werden können [27]. Dies gelingt ebenfalls mittels MACS [51]. Die genannten Studien basieren auf der Verwendung des Lektins GSA-FITC als spezifischen Marker für die Basalzellen der Ratte. In einer weiteren Studie wird versucht, eine Population aus humanen Basalzellen durch Verwendung von GSA-FITC im FACS anzureichern [52]. Problematisch erscheint aber, dass sich die Spezifität von GSA für Basalzellen der Ratte nicht uneingeschränkt auf humane Basalzellen übertragen lässt, da diese nicht gebunden werden [44]. Eine andere Aussage lautet, dass ein positiver Nachweis von humanen Basalzellen mit dem Lektin GSA nur bei Sekretoren der Blutgruppen B und AB möglich ist [74]. In der vorliegenden Arbeit führt die magnetische Zellseparation mit GSA-FITC lediglich zur

einer positiven Fraktion von ca. 5% und unterscheidet sich damit nur unwesentlich von dem methodischen Fehler, der 2% beträgt. Die Überprüfung der Bindungsspezifität von GSA-FITC an nativen Kryoschnitten führt bei allen drei Patienten zu einem negativen Resultat. Die Tauglichkeit von GSA-FITC zur Separation von humanen Basalzellen steht somit zur Disposition.

MACS mit AK CD44S:

Die magnetische Separation mit AK CD44S ergibt eine positive Fraktion von durchschnittlich 11% und hebt sich klar vom methodischen Fehler mit 2% ab. Bezogen auf die Anzahl der zurückgewonnenen Zellen ergibt sich sogar eine Ausbeute von 20% positiven Zellen. Die Ausbeute ist ein relatives Maß und berücksichtigt die variierenden Zellverluste, die während der magnetischen Markierung und Separation entstehen. Trotz der guten Separationsergebnisse muss es als nachteilig angesehen werden, dass der AK CD44S nicht monospezifisch für Basalzellen ist, sondern auch die Erythrozyten und Fibroblasten bindet [86]. Die Erythrozyten können problemlos durch die Dichtezentrifugation mit dem Percoll-Gradienten entfernt werden und beeinflussen somit die Kultivierung nicht. Hingegen stellen die Fibroblasten trotz sorgfältiger Präparation eine potenzielle Quelle der Kontamination dar, weil sie in der Kultur proliferieren und morphologisch den Basalzellen ähnlich sind [27]. Deshalb sollten bei der Anreicherung von Basalzellen mittels MACS nur epithelrestriktive Antikörper, wie z.B. AK gegen die variablen Isoformen von CD44, verwendet werden.

MACS mit AK CD44v6:

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals der Marker AK CD44v6 verwendet, um Basalzellen des humanen respiratorischen Epithels mittels MACS zu separieren. Tatsächlich lässt sich eine Ausbeute von 20% positiven Zellen erreichen, bei einer maximalen Frequenz von 31% Basalzellen [28]. Die Rate der Zellrückgewinnung beträgt über 50%. Der Verlust der restlichen Zellen ist auf die wiederholten Waschschriffe bei der magnetischen Markierung und die Verwendung eines Vorfilters vor der Trennsäule zurückzuführen. Die HRE-Zellen reagieren empfindlich auf mechanische Scherkräfte, die während der magnetischen Separation auftreten. So sinkt die Vitalität in der

positiven Fraktion um maximal 20% im Vergleich zu unseparierten HRE-Zellen. Die separierten HRE-Zellen weisen trotzdem eine ausreichende Vitalität auf und können über eine Woche erfolgreich kultiviert werden. In der Literatur wird innerhalb des respiratorischen Epithels den Basalzellen die höchste Proliferationskapazität zugeschrieben [51]. Wider Erwarten ergeben sich für die potenziellen Basalzellen aus der positiven Fraktion keine Vorteile bezüglich der Proliferation. Stattdessen weisen alle separierten HRE-Zellen eine initial verminderte Adhärenz und geringere Proliferation im Vergleich zu den unseparierten HRE-Zellen auf. Eine verminderte Vitalität beeinflusst sowohl die Adhärenz als auch die Proliferation. Die Besetzung von oberflächlichen Adhäsionsmolekülen durch Antikörper-Microbeads-Komplexe kann zu einer verzögerten Adhärenz führen. Nach Angaben der Firma Miltenyi Biotec sind diese Komplexe auf den Zielzellen insofern biodegradierbar, da sie innerhalb einer Woche dissoziieren oder durch intrazelluläre Endozytose eliminiert werden. Insgesamt besteht aber kein Hinweis auf eine permanente Schädigung der separierten HRE-Zellen, da sie spätestens nach einer Passage wieder adäquates Proliferationsverhalten zeigen.

MACS von Vorläuferzellen aus Primärkultur:

Im Rahmen der magnetischen Separation von Vorläuferzellen aus primär kultivierten HRE-Zellen ist zu erwarten, dass sich überwiegend die Vorläuferzellen des humanen respiratorischen Epithels in der Kultur vermehren, sodass ihr Anteil proportional zunimmt. Dies würde den Beobachtungen aus der immunhistochemischen Auswertung der ALI-Kulturen entsprechen. Eine Steigerung der Ausbeute im MACS kann aber nur für AK CD44S mit einer Zunahme um 15% verzeichnet werden. Für AK CD44v6 kommt es hingegen zu einer Reduzierung der Ausbeute um 10%, obwohl die immunhistochemische Auswertung der ALI-Kulturen eine verstärkte Präsenz von CD44v6 zeigt. Die verminderte Ausbeute kann z. B. auf eine mangelnde Stabilität des Antigens CD44v6 zurückzuführen sein.

Stabilität des Antigens CD44v6:

Die Exprimierung des Antigens CD44v6 kann im nativen respiratorischen Gewebe und nach ca. drei Tagen in ALI-Kultur sicher nachgewiesen werden. Dagegen ist fraglich, ob

das Antigen CD44v6 trotz enzymatischer Inkubation mit Dispase bzw. mit Trypsin vollständig erhalten bleibt oder erst durch De-Novo-Synthese wieder exprimiert wird. Die Inkubation mit Trypsin bewirkt nämlich, dass sich KP8D4, ein anderes Antigen auf humanen Basalzellen, anschließend nicht mehr durch monoklonale AK nachweisen lässt [87]. Alternativ zum Trypsin kann Accutase zur enzymatischen Dissoziation von adhärennten Monolayerkulturen eingesetzt werden [88]. Eine Modifizierung der enzymatischen Isolierung der HRE-Zellen aus dem Gewebeverband könnte in der Verwendung der proteolytischen Enzyme Pronase und Kollagenase anstelle von Dispase bestehen [53].

Weiterhin wird in der Literatur das Phänomen der rezeptormediierten Endozytose beschrieben [89, 90]. Dabei ist die Bindung des Antikörpers an das oberflächliche Epitop der Auslöser für seine intrazelluläre Endozytose. Die faktische Anzahl an extrazellulären Epitopen wird dadurch vermindert. Dieser Umsatz kann z. B. bei Chondrozyten innerhalb von vier Stunden zu einer Verminderung des Oberflächenantigens CD44 um ca. 20% führen [91]. Die Stabilität des Antigens CD44v6 auf frisch isolierten Zellen kann vorzugsweise im Durchflusszytometer durch fluoreszenz-konjugierte AK eindeutig überprüft werden.

FACS-Analyse der magnetischen Separation:

Die Effizienz der Zellseparation ist aus der FACS-Analyse ersichtlich. Die ungefärbte Originalfraktion wird als Negativkontrolle benötigt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu berücksichtigen [92]. In der gefärbten Originalfraktion sollten zwei Populationen von unterschiedlicher Intensität bezüglich des Parameters FITC zu finden sein. Optimale Ergebnisse werden durch Titration des Primärantikörpers erreicht [47]. Für eine hohe Rückgewinnung sollen möglichst wenige Zielzellen (hier Basalzellen) in der negativen Fraktion verbleiben. Weiterhin soll eine hohe Reinheit an Zielzellen erreicht werden, sodass in der positiven Fraktion außer den Basalzellen keine weiteren Zellen enthalten sind. Generell besteht ein Zielkonflikt zwischen Rückgewinnung und Reinheit bei der Zellseparation, da die Erhöhung der Reinheit zu einer geringeren Rückgewinnung führt und umgekehrt [47].

Die Versuche mit FITC zur Signalgebung im FACS verlaufen suboptimal, da es zwischen der positiven und negativen Fraktion nur zu einer marginalen Rechtsverschiebung kommt. Deshalb muss auf eine Angabe der Reinheit der separierten Fraktionen verzichtet werden. Mögliche Störfaktoren sind unersichtlich, können aber unter Umständen auf eine Beschädigung des Epitops durch den Dispase-Verdau bzw. die Trypsin-Einwirkung oder auf den Färbevorgang selbst zurückzuführen sein. Eine verminderte Intensität der Fluoreszenz aufgrund der Konjugation mit Microbeads wird durch Kontrollen ohne Microbeads ausgeschlossen.

4.4 Ausblick

Zellmarker für Basalzellen spielen sowohl für die Diagnostik als auch für die Zellseparation eine wichtige Rolle. Die magnetische Separation von Basalzellen aus dem humanen respiratorischen Epithel erfordert spezifische Marker, die an extrazelluläre Epitope binden. So gilt die epithelrestriktive Isoform CD44v9 neben CD44v6 als ein weiterer potenzieller extrazellulärer Marker für Basalzellen [82]. Das Integrin $\alpha 6\beta 4$ kommt als Bestandteil der Hemidesmosomen ausschließlich auf Basalzellen vor, die deshalb durch monoklonale AK spezifisch gebunden werden können [19].

Die mukoziliäre Differenzierung der HRE-Zellen im Air-Liquid-Interface kann durch additionalen Faktoren wie z. B. Vitamin A gefördert werden [93]. Außerdem induziert der Serumersatz Ultrosor G die Ziliogenese [94]. Weiterhin ist eine Co-Kultivierung von HRE-Zellen mit Chondrozyten oder Fibroblasten im ALI denkbar, um das Milieu der Trachea mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren in vitro zu simulieren [95].

Das noch junge Forschungsgebiet „Tissue Engineering“ eröffnet neue Perspektiven in der Herstellung von autologen Gewebetransplantaten für die Kopf-Hals-Chirurgie und könnte das Problem der begrenzten Verfügbarkeit von autologen Ersatzmaterialien lösen [3]. Studien zur Herstellung eines Trachealersatzes aus autologem Knorpel sind vielversprechend. Eine klinische Anwendung scheitert aber bisher an einer insuffizienten Epithelisierung und der damit verbundenen Restenosierung [9]. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Möglichkeit aufgezeigt, Vorläuferzellen durch magnetische Separation aus dem humanen respiratorischen Epithel anzureichern. Hierdurch stehen nun vitale Vorläuferzellen zur Verfügung, die eine ausreichende

Proliferationskapazität und das Potenzial zur Differenzierung besitzen, um einen bioartifiziellen Trachealersatz mit einem funktionellen respiratorischen Epithel auszustatten. Im Tiermodell und durch weiterführende Differenzierungsversuche im Zwei-Phasen-Kultursystem muss noch gezeigt werden, inwiefern auf dieser Basis ein in vitro hergestelltes Knorpel-Epithel-Transplantat den klinischen Anforderungen entspricht.

5 Zusammenfassung

Hintergrund:

Eine operative Rekonstruktion der Trachea ist erforderlich, wenn langstreckige Stenosen oder substanzielle Defekte auftreten. Der klinische Einsatz von bioartifiziellen Trachealprothesen scheitert bisher an einer unzureichenden Besiedelung mit einem funktionellen respiratorischen Epithel. Dies kann zu Komplikationen wie Infektionen oder einer Obstruktion des Prothesenlumens durch Granulationsgewebe führen. Das humane respiratorische Epithel setzt sich aus Zilienzellen, Becherzellen und Basalzellen zusammen. Dabei gelten letztere als Vorläuferzellen, da sie das Potenzial zur Proliferation und Differenzierung besitzen. Das respiratorische Epithel sorgt mit seinem gerichteten Zilienschlag für die mukoziliäre Clearance, die auch nach rekonstruktiven Eingriffen an der Trachea intakt sein sollte. Eine Möglichkeit der Epithelisierung von Trachealprothesen besteht in der In-vitro-Herstellung von autologen Epitheltransplantaten. Dieses Vorgehen soll durch die Methoden des Tissue Engineerings gewährleistet werden. Hierbei kann durch Kultivierung und Differenzierung autologer Zellen sowie durch Verwendung von biokompatiblen Trägermaterialien ein funktionelles Gewebetransplantat hergestellt werden. Die Ziele der vorliegenden Arbeit beinhalten die enzymatische Isolierung von vitalen humanen respiratorischen Epithelzellen sowie deren Vermehrung unter Wahrung typischer morphologischer Eigenschaften. Aufgrund der Fähigkeit der Vorläuferzellen zur Proliferation und Differenzierung ist ihre Anreicherung mittels magnetischer Zellseparation (MACS) durch spezifische Basalzellenmarker von besonderem Interesse.

Methoden:

Aus den operativ entnommenen Conchae nasales inferiores von 80 Patienten (mittleres Alter 40 ± 14 Jahre) werden durch enzymatischen Verdau mit Dispase II (2,4 U/ml) die humanen respiratorischen Epithelzellen (HRE-Zellen) aus dem Gewebeverband isoliert. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgt in serumfreiem AECG-Medium auf Kollagen A, das die Adhärenz der Zellen fördern soll, sowie in einem Zwei-Phasen-Kultursystem (Air-Liquid-Interface), um eine Differenzierung zu induzieren. Die Vorläuferzellen aus dem Epithelzellgemisch werden mit dem Lektin GSA I B4 sowie mit den

monoklonalen Antikörpern CD44S und CD44v6 extrazellulär markiert und anschließend mit magnetischen Microbeads konjugiert. Hierdurch wird eine positive Selektion der Vorläuferzellen mittels MACS ermöglicht. Eine zusätzliche Fluoreszenzmarkierung mit FITC erlaubt die Kontrolle der Zellseparation im Durchflusszytometer. Durch Immunhistologie werden die Bindungsspezifitäten der monoklonalen Antikörper (CD44S, CD44v6, 3 β E12) und der Lektine (GSA I B4, PNA, UEA) an Kryoschnitten von nativem respiratorischem Gewebe und an Zellkulturen überprüft. Der Nachweis von sauren Proteoglykanen im Sekret der Becherzellen erfolgt histologisch durch die Alcianblau-Färbung.

Ergebnisse:

Die Präparation der Nasenmuscheln ergibt Einzelzellsuspensionen aus vitalen HRE-Zellen (Vitalität > 80%, n = 30). Eine Beschichtung der Kulturoberfläche mit Kollagen A steigert die Adhärenz der HRE-Zellen signifikant ($p \leq 0,0145$, n = 5), die bereits nach 12h weitgehend (zu ca. 2/3) abgeschlossen ist. In Monolayerkulturen nehmen die HRE-Zellen nach Erreichen der Konfluenz eine typische kopfsteinpflasterartige Morphologie an. Sie wachsen aber sukzessive ohne erkennbare Kontaktinhibition im Bilayer weiter. In Air-Liquid-Interface-Kulturen lassen sich die Zellen im Monolayer immunhistochemisch mit CD44v6 überwiegend (zu ca. 2/3) als Vorläuferzellen identifizieren, während die Zellen im Bilayer eine anfängliche Differenzierung zeigen. In Kultur benötigen die HRE-Zellen in der Log-Phase etwa einen Tag zur Verdoppelung (Populationsverdoppelungszeit = 23h, n = 3). Durch Subkultivierung über vier Passagen während eines Monats ist eine exponentielle Zellvermehrung (383fach, n = 6) möglich. Hierbei sind morphologische Merkmale wie Kinozilien und Synthese von Muzinen bereits nach einer Passage regredient. Die magnetische Zellseparation ergibt für die beiden Zellmarker CD44S (n = 3) und CD44v6 (n = 5) eine positive Zellfraktion von je ca. 20%. In der Immunhistochemie erweist sich nur die epithelrestriktive Isoform CD44v6 als spezifisch für Basalzellen, während CD44S neben Basalzellen auch Fibroblasten und Erythrozyten bindet. Hingegen ist eine spezifische Bindung von GSA I B4 weder im MACS noch in der Immunhistochemie erkennbar. Die anschließende Analyse der Zellseparation im Durchflusszytometer liefert aufgrund einer geringen Fluoreszenzintensität von FITC kein eindeutiges Ergebnis bezüglich der

Reinheit der separierten Zellfraktionen. Diese weisen alle in Kultur zunächst ein vermindertes Adhärenzverhalten, aber nach einer Woche ein adäquates Proliferationsverhalten auf.

Schlussfolgerung:

Die Ansätze des Tissue Engineerings zur Epithelisierung einer bioartifiziellen Trachealprothese sind vielversprechend, denn die Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche Isolierung von vitalen HRE-Zellen sowie ihre Vermehrung in Monolayerkulturen unter Beibehaltung phänotypischer Eigenschaften. Die Vorläuferzellen des humanen respiratorischen Epithels werden durch den Zellmarker CD44v6 spezifisch gebunden, was ihre selektive Anreicherung durch die magnetische Separation ermöglicht.

Literaturverzeichnis:

- [1] Terada, S.; Sato, M.; Sevy, A. und Vacanti, J. P. (2000): Tissue engineering in the twenty-first century, *Yonsei Med J* (Band 41), Nr. 6, Seite 685-91.
- [2] Nerem, R. M. (2000): Tissue engineering: confronting the transplantation crisis, *Proc Inst Mech Eng [H]* (Band 214), Nr. 1, Seite 95-9.
- [3] Haisch, A.; Schultz, O.; Perka, C.; Jahnke, V.; Burmester, G. R. und Sittinger, M. (1996): [Tissue engineering of human cartilage tissue for reconstructive surgery using biocompatible resorbable fibrin gel and polymer carriers], *Hno* (Band 44), Nr. 11, Seite 624-9.
- [4] Rohen, J. W. (1994): Funktionelle Anatomie des Menschen, 8. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, ISBN: 3-7945-1670-2.
- [5] Junqueira, L.C. und Carneiro, J. (1996): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio, ISBN: 3-540-60404-9.
- [6] Berghaus, A.; Rettinger, G. und Böhme, G. (1996): Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Duale Reihe, Hippokrates Verlag, Stuttgart, ISBN: 3-7773-0944-3.
- [7] Har-El, G.; Shaha, A.; Chaudry, R. und Lucente, FE. (1993): Resection of tracheal stenosis with end-to-end anastomosis, *Ann Otol Rhinol Laryngol* (Band 102), Nr. 9, Seite 670-4.
- [8] Wright, C. D.; Graham, B. B.; Grillo, H. C.; Wain, J. C. und Mathisen, D. J. (2002): Pediatric tracheal surgery, *Ann Thorac Surg* (Band 74), Nr. 2, Seite 308-13; discussion 314.
- [9] Grillo, H. C. (2002): Tracheal replacement: a critical review, *Ann Thorac Surg* (Band 73), Nr. 6, Seite 1995-2004.
- [10] Olze, H.; Gerhardt, H. J. und Kaschke, O. (1998): [Long-term results after modified Rethi-plasty in childhood], *Laryngorhinootologie* (Band 77), Nr. 7, Seite 371-5.
- [11] Sonett, J. R.; Keenan, R. J.; Ferson, P. F.; Griffith, B. P. und Landreneau, R. J.

- (1995): Endobronchial management of benign, malignant, and lung transplantation airway stenoses, *Ann Thorac Surg* (Band 59), Nr. 6, Seite 1417-22.
- [12] Olze, H.; Dorffel, W. und Kaschke, O. (2001): [Endotracheal silicon stents in therapy management of benign tracheal stenoses], *Hno* (Band 49), Nr. 11, Seite 895-901.
- [13] Cull, DL.; Lally, KP.; Mair, EA.; Daidone, M. und Parsons, DS. (1990): Tracheal reconstruction with polytetrafluoroethylene graft in dogs, *Ann Thorac Surg* (Band 50), Nr. 6, Seite 899-901.
- [14] Olze, H.; Kaschke, O. und Muller, W. D. (1997): [Improving the design of an alloplastic epithelialized tracheal prosthesis], *Hno* (Band 45), Nr. 6, Seite 453-9.
- [15] Villegas-Cabello, O.; Vazquez-Juarez, J. L.; Gutierrez-Perez, F. M.; Davila-Cordova, R. F. und Diaz-Montemayor, C. (1994): Staged replacement of the canine trachea with ringed polyethylene terephthalate grafts, *Thorac Cardiovasc Surg* (Band 42), Nr. 5, Seite 302-5.
- [16] Messineo, A.; Filler, R. M.; Bahoric, B.; Smith, C. und Bahoric, A. (1991): Successful tracheal autotransplantation with a vascularized omental flap, *J Pediatr Surg* (Band 26), Nr. 11, Seite 1296-300.
- [17] Delaere, P. R.; Blondeel, P. N.; Hermans, R.; Guelinckx, P. J. und Feenstra, L. (1997): Use of a composite fascial carrier for laryngotracheal reconstruction, *Ann Otol Rhinol Laryngol* (Band 106), Nr. 3, Seite 175-81.
- [18] Bucher, O. und Wartenberg, H. (1997): *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 12. Auflage, Huber Verlag, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle, ISBN: 3-456-82785-7.
- [19] Roche, W. R.; Montefort, S.; Baker, J. und Holgate, S. T. (1993): Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium, *Am Rev Respir Dis* (Band 148), Nr. 6 Pt 2, Seite S79-82.
- [20] Evans, M. J.; Van Winkle, L. S.; Fanucchi, M. V. und Plopper, C. G. (2001): Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium, *Exp Lung Res* (Band 27), Nr. 5, Seite 401-15.
- [21] Kim, K. C.; McCracken, K.; Lee, B. C.; Shin, C. Y.; Jo, M. J.; Lee, C. J. und Ko, K.

- H. (1997): Airway goblet cell mucin: its structure and regulation of secretion, *Eur Respir J* (Band 10), Nr. 11, Seite 2644-9.
- [22] Puchelle, E. und Peault, B. (2000): Human airway xenograft models of epithelial cell regeneration, *Respir Res* (Band 1), Nr. 3, Seite 125-8.
- [23] Inayama, Y.; Hook, G. E.; Brody, A. R.; Jetten, A. M.; Gray, T.; Mahler, J. und Nettlesheim, P. (1989): In vitro and in vivo growth and differentiation of clones of tracheal basal cells, *Am J Pathol* (Band 134), Nr. 3, Seite 539-49.
- [24] Johnson, N. F. und Hubbs, A. F. (1990): Epithelial progenitor cells in the rat trachea, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 3), Nr. 6, Seite 579-85.
- [25] Borthwick, D. W.; Shahbazian, M.; Krantz, Q. T.; Dorin, J. R. und Randell, S. H. (2001): Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 24), Nr. 6, Seite 662-70.
- [26] Inayama, Y.; Hook, G. E.; Brody, A. R.; Cameron, G. S.; Jetten, A. M.; Gilmore, L. B.; Gray, T. und Nettlesheim, P. (1988): The differentiation potential of tracheal basal cells, *Lab Invest* (Band 58), Nr. 6, Seite 706-17.
- [27] Ford, J. R. und Terzaghi-Howe, M. (1992): Basal cells are the progenitors of primary tracheal epithelial cell cultures, *Exp Cell Res* (Band 198), Nr. 1, Seite 69-77.
- [28] Boers, J. E.; Ambergen, A. W. und Thunnissen, F. B. (1998): Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium, *Am J Respir Crit Care Med* (Band 157), Nr. 6 Pt 1, Seite 2000-6.
- [29] Erjefalt, J. S.; Sundler, F. und Persson, C. G. (1997): Epithelial barrier formation by airway basal cells, *Thorax* (Band 52), Nr. 3, Seite 213-7.
- [30] Arnold, W. und Ganzer, U. (1997): Checkliste Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, ISBN: 3-13-103411-4.
- [31] Ziegelaar, B. W.; Aigner, J.; Staudenmaier, R.; Lempart, K.; Mack, B.; Happ, T.; Sittinger, M.; Endres, M.; Naumann, A.; Kastenbauer, E. und Rotter, N. (2002): The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement, *Biomaterials* (Band 23), Nr. 6, Seite 1425-38.

- [32] Nerem, R. M. (1992): Tissue engineering in the USA, *Med Biol Eng Comput* (Band 30), Nr. 4, Seite CE8-12.
- [33] Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O. und Peterson, L. (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N Engl J Med* (Band 331), Nr. 14, Seite 889-95.
- [34] Erggelet, C.; Sittinger, M. und Lahm, A. (2003): The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint, *Arthroscopy* (Band 19), Nr. 1, Seite 108-10.
- [35] Horch, R. E.; Bannasch, H. und Stark, G. B. (2001): Transplantation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds, *Transplant Proc* (Band 33), Nr. 1-2, Seite 642-4.
- [36] Schmelzeisen, R.; Schimming, R. und Sittinger, M. (2003): Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report, *J Craniomaxillofac Surg* (Band 31), Nr. 1, Seite 34-9.
- [37] Vacanti, C. A.; Paige, K. T.; Kim, W. S.; Sakata, J.; Upton, J. und Vacanti, J. P. (1994): Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage, *J Pediatr Surg* (Band 29), Nr. 2, Seite 201-4; discussion 204-5.
- [38] Kojima, K.; Bonassar, L. J.; Roy, A. K.; Vacanti, C. A. und Cortiella, J. (2002): Autologous tissue-engineered trachea with sheep nasal chondrocytes, *J Thorac Cardiovasc Surg* (Band 123), Nr. 6, Seite 1177-84.
- [39] Dupuit, F.; Gaillard, D.; Hinnrasky, J.; Mongodin, E.; de Bentzmann, S.; Copreni, E. und Puchelle, E. (2000): Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 278), Nr. 1, Seite L165-76.
- [40] Chopra, D. P.; Kern, R. C.; Mathieu, P. A. und Jacobs, J. R. (1992): Successful in vitro growth of human respiratory epithelium on a tracheal prosthesis, *Laryngoscope* (Band 102), Nr. 5, Seite 528-31.
- [41] Ringe, J.; Kaps, C.; Burmester, G. R. und Sittinger, M. (2002): Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs, *Naturwissenschaften* (Band 89), Nr. 8, Seite 338-51.

- [42] Ringe, J.; Kaps, C.; Schmitt, B.; Buscher, K.; Bartel, J.; Smolian, H.; Schultz, O.; Burmester, G. R.; Haupl, T. und Sittinger, M. (2002): Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages, *Cell Tissue Res* (Band 307), Nr. 3, Seite 321-7.
- [43] Otori, N.; Carlsoo, B. und Stierna, P. (1998): Changes in glycoconjugate expression of the sinus mucosa during experimental sinusitis: a lectin histochemical study of the epithelium and goblet cell development, *Acta Otolaryngol* (Band 118), Nr. 2, Seite 248-56.
- [44] Dorscheid, D. R.; Conforti, A. E.; Hamann, K. J.; Rabe, K. F. und White, S. R. (1999): Characterization of cell surface lectin-binding patterns of human airway epithelium, *Histochem J* (Band 31), Nr. 3, Seite 145-51.
- [45] Mackay, C. R.; Terpe, H. J.; Stauder, R.; Marston, W. L.; Stark, H. und Gunthert, U. (1994): Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans, *J Cell Biol* (Band 124), Nr. 1-2, Seite 71-82.
- [46] Kasper, M.; Gunthert, U.; Dall, P.; Kayser, K.; Schuh, D.; Haroske, G. und Muller, M. (1995): Distinct expression patterns of CD44 isoforms during human lung development and in pulmonary fibrosis, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 13), Nr. 6, Seite 648-56.
- [47] Göttlinger, C. und Radbruch, A. (1993): Methoden der Zelltrennung, *mta* 8, Seite 530-536.
- [48] Takizawa, H.; Romberger, D.; Beckmann, J. D.; Matsuda, T.; Eccleston-Joyner, C.; Shoji, S.; Rickard, K. A.; Claassen, L. R.; Ertl, R. F.; Linder, J. und et al. (1990): Separation of bovine bronchial epithelial cell subpopulations by density centrifugation: a method to isolate ciliated and nonciliated cell fractions, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 3), Nr. 6, Seite 553-62.
- [49] Bals, R.; Welsch, U. und Bosch, T. C. (1998): Isolation and molecular characterization of serous and mucous gland cells of the porcine airways, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 18), Nr. 4, Seite 548-53.
- [50] Miltenyi, S.; Muller, W.; Weichel, W. und Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS, *Cytometry* (Band 11), Nr. 2, Seite 231-8.

- [51] Ford, J. R. und Terzaghi-Howe, M. (1992): Characteristics of magnetically separated rat tracheal epithelial cell populations, *Am J Physiol* (Band 263), Nr. 5 Pt 1, Seite L568-74.
- [52] Hicks, W., Jr.; Hall, L., 3rd; Sigurdson, L.; Stewart, C.; Hard, R.; Winston, J. und Lwebuga-Mukasa, J. (1997): Isolation and characterization of basal cells from human upper respiratory epithelium, *Exp Cell Res* (Band 237), Nr. 2, Seite 357-63.
- [53] Lindl, T. (2000): *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN: 3-8274-0803-2.
- [54] Dörner, K. und Battista, H.-J. (1998): *Klinische Chemie und Hämatologie*, 3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, ISBN: 3-432-97313-6.
- [55] Brunner, E. und Langer, F. (1999): *Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten*, Oldenbourg Verlag, München, Wien, ISBN: 3-486-24915-0.
- [56] Delplanque, A.; Coraux, C.; Tirouvanziam, R.; Khazaal, I.; Puchelle, E.; Ambros, P.; Gaillard, D. und Peault, B. (2000): Epithelial stem cell-mediated development of the human respiratory mucosa in SCID mice, *J Cell Sci* (Band 113), Nr. Pt 5, Seite 767-78.
- [57] Johnson, N. F.; Margiotta, E. A.; Wilson, J. S.; Sebring, R. J. und Smith, D. M. (1987): Preparation of viable single cell suspensions of tracheal epithelial cells, *Br J Exp Pathol* (Band 68), Nr. 2, Seite 157-65.
- [58] Chopra, D. P.; Sullivan, J.; Wille, J. J. und Siddiqui, K. M. (1987): Propagation of differentiating normal human tracheobronchial epithelial cells in serum-free medium, *J Cell Physiol* (Band 130), Nr. 2, Seite 173-81.
- [59] Kowalski, M. L.; Pawliczak, R.; Wozniak, J.; Siuda, K.; Grzegorzczak, J.; Pietrzak, M.; Kozłowski, Z. und Marek, K. (1998): Culture of human nasal epithelial cells from nasal polyps on collagen matrix, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (Band 46), Nr. 1, Seite 51-7.
- [60] Hanamure, Y.; Deguchi, K. und Ohyama, M. (1994): Ciliogenesis and mucus synthesis in cultured human respiratory epithelial cells, *Ann Otol Rhinol Laryngol* (Band 103), Nr. 11, Seite 889-95.

- [61] Bucheler, M.; Scheffler, B.; von Foerster, U.; Bruinink, A.; Bootz, F. und Wintermantel, E. (2000): [Growth of human respiratory epithelium on collagen foil], *Laryngorhinootologie* (Band 79), Nr. 3, Seite 160-4.
- [62] Jorissen, M.; Van der Schueren, B.; Van den Berghe, H. und Cassiman, J. J. (1989): The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro, *Arch Otorhinolaryngol* (Band 246), Nr. 5, Seite 308-14.
- [63] Chang, L. Y.; Wu, R. und Nettesheim, P. (1985): Morphological changes in rat tracheal cells during the adaptive and early growth phase in primary cell culture, *J Cell Sci* (Band 74), Seite 283-301.
- [64] Koide, N.; Sakaguchi, K.; Koide, Y.; Asano, K.; Kawaguchi, M.; Matsushima, H.; Takenami, T.; Shinji, T.; Mori, M. und Tsuji, T. (1990): Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments, *Exp Cell Res* (Band 186), Nr. 2, Seite 227-35.
- [65] Chevillard, M.; Hinrasky, J.; Zahm, J. M.; Plotkowski, M. C. und Puchelle, E. (1991): Proliferation, differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary culture, *Cell Tissue Res* (Band 264), Nr. 1, Seite 49-55.
- [66] Benali, R.; Tournier, J. M.; Chevillard, M.; Zahm, J. M.; Klossek, J. M.; Hinrasky, J.; Gaillard, D.; Maquart, F. X. und Puchelle, E. (1993): Tubule formation by human surface respiratory epithelial cells cultured in a three-dimensional collagen lattice, *Am J Physiol* (Band 264), Nr. 2 Pt 1, Seite L183-92.
- [67] Gray, T. E.; Guzman, K.; Davis, C. W.; Abdullah, L. H. und Nettesheim, P. (1996): Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 14), Nr. 1, Seite 104-12.
- [68] Sittinger, M. (1994): In vitro Herstellung von vitalem Knorpelgewebe mit Hilfe resorbierbarer Polymere, Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium, Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin, Universität Regensburg.
- [69] Noguchi, Y.; Uchida, Y.; Endo, T.; Ninomiya, H.; Nomura, A.; Sakamoto, T.; Goto, Y.; Haraoka, S.; Shimokama, T.; Watanabe, T. und et al. (1995): The induction of cell differentiation and polarity of tracheal epithelium cultured on the amniotic

- membrane, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 210), Nr. 2, Seite 302-9.
- [70] Liu, J. Y.; Nettekheim, P. und Randell, S. H. (1994): Growth and differentiation of tracheal epithelial progenitor cells, *Am J Physiol* (Band 266), Nr. 3 Pt 1, Seite L296-307.
- [71] Aitken, M. L.; Villalon, M.; Pier, M.; Verdugo, P. und Nameroff, M. (1993): Characterization of a marker of differentiation for tracheal ciliated cells independent of ciliation, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 9), Nr. 1, Seite 26-32.
- [72] Kishioka, C.; Shimizu, T.; Fujita, K.; Ito, Y.; Majima, Y. und Sakakura, Y. (1999): Monoclonal antibody-detectable carbohydrate epitopes of human nasal secretions are differentially expressed in tissue and diseases, *Am J Rhinol* (Band 13), Nr. 1, Seite 37-43.
- [73] Wasano, K.; Kim, K. C.; Niles, R. M. und Brody, J. S. (1988): Membrane differentiation markers of airway epithelial secretory cells, *J Histochem Cytochem* (Band 36), Nr. 2, Seite 167-78.
- [74] Bals, R. und Welsch, U. (1997): Lectins and antibodies to blood group antigens as markers for the basal cells of the human respiratory epithelium, *Microsc Res Tech* (Band 38), Nr. 5, Seite 505-11.
- [75] Hassid, S.; Salmon, I.; Brugmans, M.; Dawance, S.; Kiss, R.; Gabius, H. J. und Danguy, A. (1997): Histochemical study of the epithelia of nasal polyps by biotinylated lectins and neoglycoprotein. A comparison with the normal human respiratory epithelium, *Eur J Morphol* (Band 35), Nr. 2, Seite 79-86.
- [76] Shimizu, T.; Nettekheim, P.; Mahler, J. F. und Randell, S. H. (1991): Cell type-specific lectin staining of the tracheobronchial epithelium of the rat: quantitative studies with *Griffonia simplicifolia* I isolectin B4, *J Histochem Cytochem* (Band 39), Nr. 1, Seite 7-14.
- [77] Purkis, P. E.; Steel, J. B.; Mackenzie, I. C.; Nathrath, W. B.; Leigh, I. M. und Lane, E. B. (1990): Antibody markers of basal cells in complex epithelia, *J Cell Sci* (Band 97), Nr. Pt 1, Seite 39-50.
- [78] Moll, R. (1993): [Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors], *Veroff Pathol.* (Band 142), Seite 1-197.

- [79] Chu, P. G. und Weiss, L. M. (2002): Keratin expression in human tissues and neoplasms, *Histopathology* (Band 40), Nr. 5, Seite 403-39.
- [80] Lesley, J.; Hascall, V. C.; Tammi, M. und Hyman, R. (2000): Hyaluronan binding by cell surface CD44, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 35, Seite 26967-75.
- [81] Wimmel, A.; Kogan, E.; Ramaswamy, A. und Schuermann, M. (2001): Variant expression of CD44 in preneoplastic lesions of the lung, *Cancer* (Band 92), Nr. 5, Seite 1231-6.
- [82] Lackie, P. M.; Baker, J. E.; Gunthert, U. und Holgate, S. T. (1997): Expression of CD44 isoforms is increased in the airway epithelium of asthmatic subjects, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 16), Nr. 1, Seite 14-22.
- [83] Leir, S. H.; Baker, J. E.; Holgate, S. T. und Lackie, P. M. (2000): Increased CD44 expression in human bronchial epithelial repair after damage or plating at low cell densities, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Band 278), Nr. 6, Seite L1129-37.
- [84] Otto, W. R. (2002): Lung epithelial stem cells, *J Pathol* (Band 197), Nr. 4, Seite 527-35.
- [85] Wigand, ME. (2002): Restitutio ad integrum: the kingsway of otorhinolaryngological surgery, *Eur Arch Otorhinolaryngol* (Band 259), Nr. 10, Seite 557-61.
- [86] Tamiolakis, D.; Kotini, A.; Cheva, A.; Jivannakis, T.; Lambropoulou, M.; Bobos, M.; Vavetsis, S. und Papadopoulos, N. (2002): Gains and losses of glycoprotein CD44 and secretory component expression in endometrial hyperplasia and neoplasia, *Eur J Gynaecol Oncol* (Band 23), Nr. 5, Seite 453-6.
- [87] Maeda, K. und Sueishi, K. (1989): A monoclonal antibody that defines basal cells of stratified epithelia in various human and rabbit tissues, *Histochemistry* (Band 92), Nr. 4, Seite 319-24.
- [88] Wachs, FP.; Couillard-Despres, S.; Engelhardt, M.; Wilhelm, D.; Ploetz, S.; Vroemen, M.; Kaesbauer, J.; Uyanik, G.; Klucken, J.; Karl, C.; Tebbing, J.; Svedsen, C.; Weidner, N.; Kuhn, HG.; Winkler, J. und Aigner, L. (2003): High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells, *Lab Invest* (Band 83), Nr. 7, Seite 949-62.

- [89] Pulczynski, S.; Boesen, A. M. und Jensen, O. M. (1993): Antibody-induced modulation and intracellular transport of CD10 and CD19 antigens in human B-cell lines: an immunofluorescence and immunoelectron microscopy study, *Blood* (Band 81), Nr. 6, Seite 1549-57.
- [90] Hua, Q.; Knudson, C. B. und Knudson, W. (1993): Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis, *J Cell Sci* (Band 106), Nr. Pt 1, Seite 365-75.
- [91] Aguiar, D. J.; Knudson, W. und Knudson, C. B. (1999): Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes, *Exp Cell Res* (Band 252), Nr. 2, Seite 292-302.
- [92] Johnson, N. F.; Wilson, J. S.; Habbersett, R.; Thomassen, D. G.; Shopp, G. M. und Smith, D. M. (1990): Separation and characterization of basal and secretory cells from the rat trachea by flow cytometry, *Cytometry* (Band 11), Nr. 3, Seite 395-405.
- [93] Million, K.; Tournier, F.; Houcine, O.; Ancian, P.; Reichert, U. und Marano, F. (2001): Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 25), Nr. 6, Seite 744-50.
- [94] Yamaya, M.; Finkbeiner, W. E.; Chun, S. Y. und Widdicombe, J. H. (1992): Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium, *Am J Physiol* (Band 262), Nr. 6 Pt 1, Seite L713-24.
- [95] Goto, Y.; Noguchi, Y.; Nomura, A.; Sakamoto, T.; Ishii, Y.; Bitoh, S.; Picton, C.; Fujita, Y.; Watanabe, T.; Hasegawa, S. und Uchida, Y. (1999): In vitro reconstitution of the tracheal epithelium, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 20), Nr. 2, Seite 312-8.

Eidesstattliche Erklärung:

Die Dissertation wurde von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst. Auch in Teilen stellt sie keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, 25. August 2004

gezeichnet: Marek Wentges

Curriculum Vitae:

	Wentges, Marek
17.12.1975	Geburt in Bonn
	Schulbildung:
08/1986 – 06/1995	Städtisches Gymnasium Gerresheim in Düsseldorf
06/1995	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
	Hochschulen:
10/1995 – 03/1997	BUGH Wuppertal, Wirtschaftswissenschaften
04/1997 – 09/2002	JLU Gießen, Humanmedizin
04/1999	Ärztliche Vorprüfung, Gießen
04/2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gießen
09/2001	1. Amerikanisches Staatsexamen, Frankfurt/Main
04/2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gießen
seit 05/2002	HU Berlin, Promotionsarbeit im Labor für Tissue Engineering, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
	Auslandsausbildung:
08/1992 – 06/1993	USA, Michigan, Portland High School
04/2000 – 07/2000	Frankreich, ERASMUS-Programm, Lille Université Faculté Libre de Médecine
02/2001 – 03/2001	Australien, Famulatur im Wollongong Hospital, Department of Emergency and Accident

Danksagung:

Mein Dank gilt allen Personen, die maßgeblich am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

PD Dr. Michael Sittinger und Dr. Christian Kaps möchte ich danken für die thematische Anregung und die wissenschaftliche Betreuung.

Michaela Endres und Iris Leinhase danke ich für unzählige Ideen und die Motivation, das Projekt anzutreiben; Dr. Heidi Olze für den Einblick in den OP und die Bereitstellung von Proben. Dr. Nicole Rotter ist verantwortlich für die gute Kooperation und den Gedankenaustausch mit der LMU München.

Mein Lob gebührt der gesamten AG Tissue Engineering für die freundliche Atmosphäre und die reibungslose Versorgung mit nahrhaftem Kuchen. Insbesondere möchte ich danken: Jochen Ringe für Einblicke in die Stammzellforschung und kritisches Hinterfragen, Johanna Golla für das umfangreiche Wissen auf dem Gebiet der Histochemie, Samuel Vetterlein für das technische Know-how im Kampf gegen den Computer und Ina Krüger für die gute Arbeitsplatzteilung an der Sicherheitswerkbank. Manja Unger, Stefan Stich und Reyk Horland danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei Dr. Carsten Lübke für die Geduld bedanken, die er trotz hartnäckigen Ausfragens bewies, und bei Alexander Loch dafür, dass ich beim International Integrated Surgery Course mitwirken konnte. Dr. Wolfgang Röckl danke ich für die aufgebrauchte Zeit und die wertvollen Vorschläge bezüglich MACS und Dr. Rudi Manz für die ausführliche Beratung am FACS. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Ro 2207/1-1) trug mit ihren Fördermitteln wesentlich zur Durchführung des Projektes bei.

Am meisten verdanke ich meiner Familie, die mich stets in meinem Handeln bestärkt, und Yvonne Mania, die mich uneingeschränkt unterstützt.