

# **Entwicklung eines rekonstruierten dreidimensionalen Schweißdrüsenmodells**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Patricia Klaka**

aus Gleiwitz

Düsseldorf, Mai 2017

extern durchgeführt bei der Firma Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf  
unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch  
aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch  
Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn i.R.  
Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2017

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	viii
Abstract .....	x
1 Einleitung .....	1
1.1 Haut und Hautanhangsgebilde .....	1
1.2 Humane Schweißdrüsen .....	4
1.2.1 Die apokrine Schweißdrüse .....	6
1.2.2 Die ekkrine Schweißdrüse .....	6
1.2.2.1 Morphologie und Funktionen der ekkrinen Schweißdrüse .....	6
1.2.2.2 Entwicklung der ekkrinen Schweißdrüse .....	9
1.2.2.3 Regulation der Körpertemperatur in der ekkrinen Schweißdrüse .....	10
1.2.2.4 Ekkriner Sekretionsmechanismus .....	13
1.2.2.5 Erkrankungen der ekkrinen Schweißdrüse .....	16
1.3 <i>In vitro</i> 2D und 3D Zellkultursysteme der ekkrinen Schweißdrüse .....	18
1.3.1 2D Zellkultursysteme der ekkrinen Schweißdrüse .....	18
1.3.2 Etablierte 3D Modelle der ekkrinen Schweißdrüse .....	19
1.3.3 2D Zellkulturen und 3D Modelle im Vergleich .....	20
1.3.4. Spezifische Marker ekkriner Schweißdrüsenzellen .....	21
1.4 Kosmetische Aspekte – Antitranspirantien und Deodorants .....	24
1.5 Ziel dieser Arbeit .....	25
2 Material und Methoden .....	26
2.1 Material .....	26
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.3 Kits .....	29
2.1.4 Geräte .....	30
2.1.5 Software .....	31
2.1.6 Puffer und Lösungen .....	32

---

2.1.7 Zellkulturmedien .....	33
2.1.8 Primer .....	34
2.1.9 Antikörper .....	34
2.2 Methoden .....	36
2.2.1 Verdau von Humanhaut und Isolation von Schweißdrüsen .....	36
2.2.2 2D Zellkultur .....	37
2.2.2.1 Subkultivierung der Primärzellen .....	37
2.2.2.2 Zellzahlbestimmung .....	37
2.2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen .....	38
2.2.2.4 Zeitrafferaufnahmen isolierter Schweißdrüsen zur Analyse des Migrationsverhaltens .....	38
2.2.2.5 Transepitheliale elektrische Widerstands (TEER)-Messung .....	39
2.2.2.6 Zytotoxizitätsanalyse mithilfe des WST-1-Tests .....	39
2.2.3 3D Modelle .....	40
2.2.3.1 Herstellung von 3D Modellen .....	40
2.2.3.2 Ernte und Vermessung von 3D Modellen .....	42
2.2.3.3 Viabilität von 3D Modellen mittels Live-Dead Assay .....	42
2.2.4 Histologische Analysen .....	43
2.2.4.1 Fixierung der Zellen .....	43
2.2.4.2 Herstellung von Schnittpräparaten .....	44
2.2.4.2.1 Gefrierschnitte .....	44
2.2.4.2.2 Paraffinschnitte .....	44
2.2.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) .....	44
2.2.4.4 Azan-Färbung .....	45
2.2.5 Molekularbiologische Analysen .....	46
2.2.5.1 Isolation von RNA und Bestimmung der RNA-Konzentration .....	46
2.2.5.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) .....	46
2.2.5.3 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR .....	47

---

2.2.5.4 Genexpressionsanalyse mittels Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung.....	48
2.2.6 Proteinbiochemische Analysen.....	49
2.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung.....	49
2.2.6.2 Durchflusszytometrie .....	50
2.2.6.3 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration .....	52
2.2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	53
2.2.6.5 Western Blot-Analyse und Immundetektion immobilisierter Proteine .	53
2.2.7 Calcium Flux Assay zur Analyse des intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Signallings.....	54
2.2.8 Integration von 3D Co-Kultur Modellen in ein Phenion-Vollhautmodell ....	55
2.2.9 Statistische Auswertung .....	56
3 Ergebnisse.....	57
3.1 Identifikation grundlegender Eigenschaften primärer ekkriner Schweißdrüsenzellen .....	57
3.1.1 Migrationsverhalten von Schweißdrüsenzellen.....	57
3.1.2 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) von Schweißdrüsenzellen .....	60
3.1.3 Morphologische Eigenschaften.....	62
3.1.3.1 Analyse der Sphärengröße in Abhängigkeit zum Zelltyp, zur Kultivierungsdauer und zur Zellzahl .....	63
3.1.3.2 Analyse der Sphären-Struktur mittels histologischer Färbung .....	65
3.1.4 Viabilität von 3D Modellen .....	67
3.2 Nachweis Schweißdrüsen-spezifischer Marker und Analyse der Differenzierung in 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse.....	74
3.2.1 Genexpressionsanalysen .....	74
3.2.1.1 Genexpressionsanalyse in 2D Zellkulturen und in 3D Modellen der Schweißdrüse .....	74

---

3.2.1.2 Genexpressionsanalyse in 3D Modellen in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit und Spendervariabilität .....	77
3.2.2 Proteinexpressionsanalysen .....	79
3.2.2.1 Proteinexpression in 3D Co-Kultur Modellen .....	81
3.2.2.2 Proteinexpression in 3D Coil-Modellen und in 3D Dukt-Modellen .....	87
3.2.2.3 Co-Lokalisation von <i>clear cells</i> und <i>dark cells</i> in 3D Modellen .....	91
3.2.3 Optimierung der Zelltyp-Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie .	93
3.2.4 Apikal-basale Polarität in 3D Co-Kultur Modellen .....	96
3.3 Cholinerge Stimulation und Ca <sup>2+</sup> -Signalling in 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse .....	98
3.3.1 Einfluss von ACh auf die Viabilität von 3D Modellen .....	98
3.3.2 Untersuchung der Genexpression nach cholinergem Stimulation .....	101
3.3.2.1 Genexpressionsanalyse mittels Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung .....	101
3.3.2.2 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR .....	105
3.3.3 Proteinexpressionsanalyse Schweißdrüsen-spezifischer Marker nach cholinergem Stimulation .....	107
3.3.4 Proteinexpression von AQP5 nach cholinergem Stimulation mittels Western Blot-Analyse .....	109
3.3.5 Nachweis des Ca <sup>2+</sup> -Einstroms in ekkrinen Schweißdrüsenzellen .....	111
3.3.5.1 Pharmakologische Reagenzien im Calcium Flux Assay .....	111
3.3.5.2 Wirkung von Agonisten und Antagonisten in 3D Co-Kultur Modellen im Calcium Flux Assay .....	112
3.4 Integration von 3D Co-Kultur Modellen in ein Phenion-Vollhautmodell .....	116
4 Diskussion .....	118
4.1 Grundlegende Eigenschaften ekkriner Schweißdrüsenzellen .....	119
4.2 Charakterisierung des rekonstruierten 3D Modells im Vergleich zur 2D Kultur sowie zur nativen Drüse .....	125
4.2.1 Nachweis spezifischer Marker mittels Genexpressionsanalyse .....	126

---

4.2.2 Nachweis spezifischer Marker mittels Proteinexpression .....	128
4.3 Cholinerge Stimulation und physiologisches Ca <sup>2+</sup> -Signalling in 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse .....	137
4.4 Integration von 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse in ein Phenion- Vollhautmodell .....	145
5 Fazit und Ausblick .....	147
6 Literaturverzeichnis .....	xii
7 Anhang .....	xxiii
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	xxiii
7.2 Tabellenverzeichnis .....	xxv
7.3 Abkürzungsverzeichnis .....	xxvi
7.4 Zusätzliche Abbildungen und Tabellen .....	xxix
Danksagungen .....	xxxii

## Zusammenfassung

Beim Menschen wird die Körpertemperatur maßgeblich über das Schwitzen reguliert. Dabei wird die Kühlung der Hautoberfläche über die Abgabe des wässrigen Schweißes von ekkrinen Schweißdrüsen erzielt. Der Schweiß dient auch der Befeuchtung der Haut, der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Immunabwehr durch die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden wie Dermcidin. Zudem sind ekkrine Schweißdrüsen an Wundheilungsprozessen der Haut, wie der Regeneration der Epidermis, beteiligt. Eine Fehlregulation des teils noch unbekanntem Sekretionsmechanismus kann Krankheiten wie beispielsweise Hyperhidrose, d.h. krankhaftes übermäßiges Schwitzen, auslösen. Da die Ursachen bisher unzureichend aufgeklärt sind, sind zur Linderung der Symptome derzeit nur wenige Wirkstoffe verfügbar. Daher ist die Identifikation weiterer kosmetischer und pharmakologischer Wirkstoffe gegen eine fehlregulierte Schweißproduktion wünschenswert. Ein Weg zur Identifikation ist die Analyse des Sekretionsmechanismus in physiologischen *in vitro* Zellkultursystemen der Schweißdrüse. Da konventionelle zweidimensionale (2D) Kulturen essentielle Marker bei der Kultivierung verlieren, eignen sich besonders organotypische dreidimensionale (3D) Modelle für die Erforschung grundlegender Prozesse. Zur Entwicklung eines neuartigen organotypischen 3D Modells der Schweißdrüse wurden erstmals Primärzellen mithilfe der *Hanging drop*-Technologie kultiviert. Die Zellen des sezernierenden Coils, welche für die Bildung des Primärschweißes verantwortlich sind, und die Zellen des Dukts, die die Funktion der Ionen-Resorption innehaben, wurden gemeinsam als Co-Kultur sowie getrennt voneinander als 3D Modell kultiviert. Nach umfassender Etablierung der Zellkulturbedingungen wurde mithilfe von Gen- und Proteinexpressionsanalysen die Differenzierung und die apikal-basale Polarität im 3D Modell anhand Schweißdrüsen-spezifischer Marker (CHRM3, NKCC1, CEACAM5, AQP5, ANO1 etc.) analysiert. Diese Marker wurden im 3D Modell im Vergleich zur 2D Kultur meist sehr ähnlich zur *in vivo* Situation exprimiert. An dieser Stelle konnte bereits die Überlegenheit des rekonstruierten 3D Modells aufgezeigt werden. Des Weiteren wies das 3D Co-Kultur Modell eine besonders hohe Korrelation der molekularen Profile zur *in vivo* Situation auf. In diesem 3D Modell konnte auch der Erhalt der Subzelltypen des Coils – *clear cells*, *dark cells* und Myoepithelzellen – nachgewiesen werden. Zudem zeigte das 3D Co-Kultur Modell eine apikal-basale Polarität, die für die Funktionalität von Epithelzellen essentiell ist. Diese konnte in 3D Modellen, die nur aus Coil- oder Dukt-

Zellen bestanden, nicht vollständig gezeigt werden. Aus diesem Grund wurden die weiteren funktionalen *in vitro* Analysen nur noch unter Verwendung des 3D Co-Kultur Modells durchgeführt. Ekkrine Schweißdrüsen werden hauptsächlich über den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) innerviert. Interessanterweise zeigten die 3D Modelle nach cholinergem Stimulation eine Veränderung des molekularen Profils, insbesondere auf Translationsebene. Ein Hinweis auf die Funktionalität des 3D Modells der ekkrinen Schweißdrüse war außerdem der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels nach cholinergem Stimulation. Denn nach Innervierung durch ACh wird intrazellulär eine Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-abhängige Signalkaskade sowie die Öffnung diverser Ionenkanäle und Transporter ausgelöst, die *in vivo* zur Bildung von Schweiß führt. Hier konnte zum ersten Mal die cholinerge Innervierung von primären ekkrinen Schweißdrüsenzellen in einem *in vitro* 3D Modell gezeigt werden. Abschließend wurden die 3D Modelle in ein *in vitro* Vollhautmodell integriert. Initiale Studien konnten vermutlich die Rekonstruktion der Epidermis in diesem *in vitro* Modell aufzeigen. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein rekonstruiertes 3D Modell der Schweißdrüse mit physiologischer Funktionalität etabliert werden, welches zur Erforschung der Regulation des Sekretionsmechanismus und von Erkrankungen, aber auch zur Analyse von Wundheilungsprozessen eingesetzt werden kann.

## Abstract

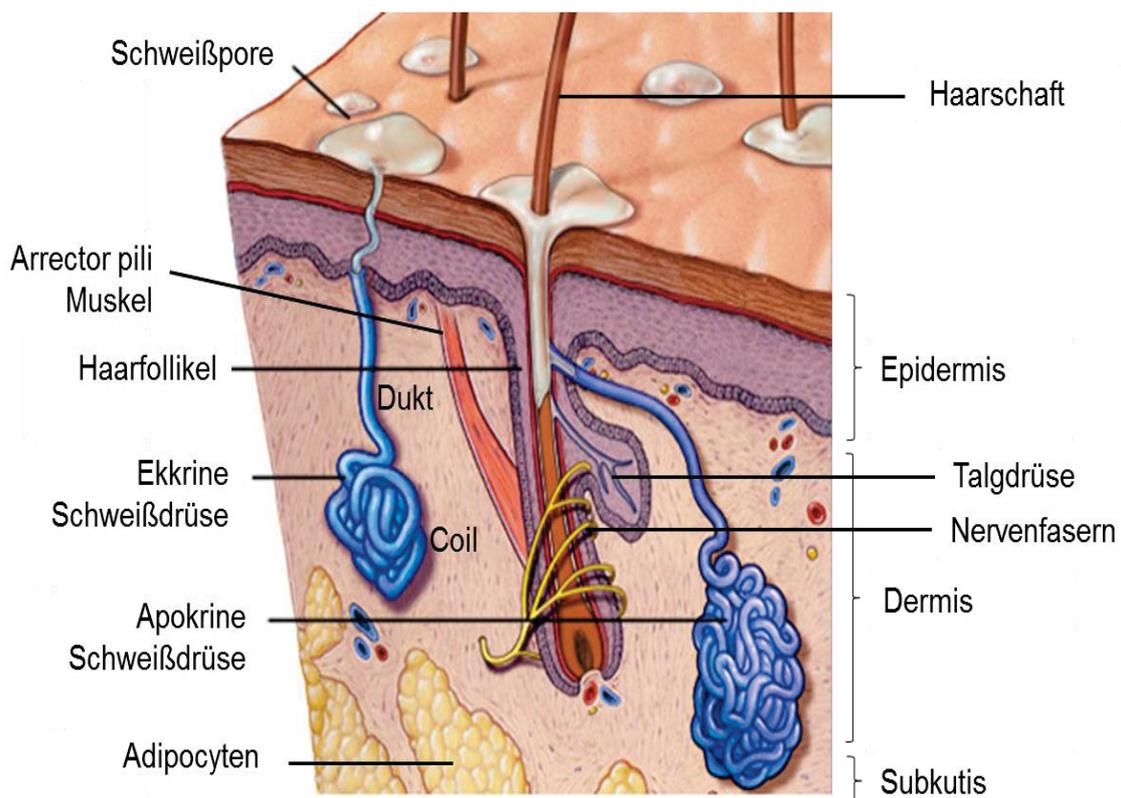
Human body temperature is mainly regulated by sweating. Cooling of the skin surface is achieved via evaporation of aqueous sweat secreted by eccrine sweat glands. Sweat glands are also involved in skin hydration, skin homeostasis and immune defense by secreting several antimicrobial peptides including dermcidin. Furthermore, sweat glands have the capacity to regenerate the epidermis during skin wound healing. Dysregulation of the partly unknown sweat mechanism can result in disorders like hyperhidrosis describing abnormal excessive sweating. Causes of these illnesses are often not illuminated, so commonly used reagents only partly ease disease symptoms. Thus, alternative cosmetic and pharmacological substances would be preferable against dysregulated sweat secretion. To elucidate these underlying regulatory secretion mechanisms a reliable physiological *in vitro* cell culture system of the sweat gland is needed. Conventional two-dimensional (2D) cultures lose typical essential markers during cultivation, so organotypic three-dimensional (3D) models are rather suitable to study fundamental mechanisms. To develop a novel organotypic 3D model of the sweat gland primary cells and the hanging drop technology were applied. The cells of the secretory coil, which are responsible for the production of primary sweat, and the duct cells, which reabsorb ions, were cultivated altogether as a co-culture or separately in the 3D model. After the investigation of cell culture conditions, gene and protein expression of sweat gland specific markers (CHRM3, NKCC1, CEACAM5, AQP5, ANO1 etc.) were studied to analyze the differentiation and the apical-basal polarity in the 3D model. In 3D models, these markers were mainly expressed like *in vivo* in comparison to 2D cultures. Here, the superiority of this reconstructed 3D model could be already shown. Especially the 3D co-culture model could demonstrate a high *in vivo* correlation of the molecular profiles. In this 3D model, maintenance of the different cell types of the secretory coil – clear cells, dark cells, and myoepithelial cells – could be observed. Furthermore, the 3D model indicated apical-basal polarity which is essential for epithelial functionality. In certain cases, this could not be verified in 3D models cultured with only coil or duct cells, so further functional *in vitro* studies were done using the 3D co-culture model. Eccrine sweat glands are predominantly innervated via the neurotransmitter acetylcholine (ACh). Interestingly, alteration in the molecular profile was detected after cholinergic stimulation, notably on proteomic level. Furthermore, functionality of the eccrine sweat gland model was confirmed by an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  level after cholinergic stimulation. Due to the fact that ACh

is released, an intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-dependent signaling pathway is activated leading to the opening of several ion channels and transporters, which *in vivo* induces the production of sweat. For the first time, physiological cholinergic innervation of primary eccrine sweat gland cells in an *in vitro* 3D model could be shown. Finally, the 3D models were integrated in a full skin model. Initial experiments possibly demonstrated a reconstructed epidermis in this *in vitro* model. Taken together, a reconstructed organotypic 3D model of the sweat gland with physiological functionality was developed in the framework of this PhD thesis. This 3D model could be implemented for research of the regulatory secretion mechanisms, in disease modeling as well as for the analysis of wound healing processes.

## 1 Einleitung

### 1.1 Haut und Hautanhangsgebilde

Die Haut stellt das größte Organ des Menschen dar und bildet eine effektive Barriere zur Umwelt. Sie bedeckt den gesamten Körper und kann beim durchschnittlichen adulten Menschen bei einer Dicke von bis zu 2 mm eine Fläche von ca. 2 m<sup>2</sup> erreichen (Jablonski, 2004). Die wichtigste Aufgabe dieses Organs besteht im Schutz des Körpers vor schädlichen physischen, chemischen und mikrobiellen Einflüssen. Außerdem reguliert die Haut den Wasserhaushalt und die Körpertemperatur durch Innervierung, Isolation sowie Schwitzen. Die Haut dient auch als Schutzschild vor UV-Strahlung und Pathogenen sowie der Kommunikation und Sinneswahrnehmung über sensorische Rezeptoren (Lumpkin & Caterina, 2007; Marte *et al.*, 2007; Wickett & Visscher, 2006).



**Abbildung 1: Haut und Hautanhangsgebilde.** Die Schichten der Haut unterteilen sich in die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Unterhautfettgewebe mit Adipocyten). Zu den Hautanhangsgebilden gehören Haarfollikel, Talgdrüsen, Schweißdrüsen sowie Nägel, die nicht dargestellt sind. Apokrine Schweißdrüsen münden in den Haarschaft, ekkrine Schweißdrüsen in die Hautoberfläche. Abbildung modifiziert nach *Mayo Foundation for medical education and research* (Mayoclinic.org).

Die Haut untergliedert sich in drei Schichten: die Epidermis (Oberhaut), die darunterliegende Dermis (Lederhaut) sowie die Subkutis (Unterhautfettgewebe) (Abb. 1) (Baur, 2015; Lai-Cheong & Mc Grath, 2009; MacNeil, 2007).

Die oberste Schicht der Haut, die Epidermis, besteht hauptsächlich aus verhornten Keratinozyten, die ein Plattenepithel bilden. Dabei ist die Epidermis wiederum aus 4 unterschiedlichen Schichten aufgebaut: das Stratum Corneum (Hornschicht), das Stratum Granulosum (Körnerzellschicht), das Stratum Spinosum (Stachelzellschicht) und das Stratum Basale (Basalzellschicht) als unterste an die Dermis angrenzende Schicht (Wickett & Visscher, 2006). Die Epidermis ist eine stetig selbst regenerierende Hautschicht und erneuert sich jeweils nach etwa 28 Tagen. Nach der Zellteilung der Basalzellen differenzieren diese und verhornen, sodass sie im Anschluss an den Verhornungsprozess abgestoßen werden (MacNeil, 2007; Wolff, 2009). Neben der Hauptzellpopulation der Keratinozyten befinden sich weitere Zelltypen in der Epidermis, die unterschiedliche Schutzfunktionen ausüben: pigmentproduzierende Melanozyten in der Basalschicht, Langerhans-Zellen in der Stachelzellschicht und Merkel-Zellen (Venus *et al.*, 2011). Langerhans-Zellen sind dendritische Immunzellen und dienen der Immunabwehr mithilfe von Antigen-Präsentation auf ihrer Oberfläche (Wickett & Visscher, 2006). Merkel-Zellen, die zu den Mechanorezeptoren gehören, sind sensorische Nervenzellen zur Sinneswahrnehmung, z.B. von mechanischem Druck (Lai-Cheong & Mc Grath, 2009; Lumpkin & Caterina, 2007; Maksimovic *et al.*, 2014).

Die Dermis stellt ein stützendes und elastisches Bindegewebe dar. Sie setzt sich aus Fasern, aus Grundsubstanz und aus zellulären Komponenten (Fibroblasten, Mastzellen, dendritische Zellen, Gewebsmakrophagen/Histiozyten) zusammen. Die nicht-zellulären Bestandteile der Dermis im Interzellularraum, die zur extrazellulären Matrix (ECM) zusammengefasst werden, sind v.a. Kollagenfasern (ca. 70 %), Elastinfasern, Retikulärfasern sowie die nicht-fibrilläre Grundsubstanz. Fasern geben dem Gewebe Struktur und bilden ein Netzwerk in der ECM aus. Die Grundsubstanz dagegen fungiert als komplexes, dynamisches und osmotisch aktives Transportsystem. Sie besteht v.a. aus Wasser, aus Glykosaminoglykanen sowie aus Proteoglykanen, wie beispielsweise Versican oder Hyaluron (Tracy *et al.*, 2016). Den Hauptanteil der zellulären Komponente der Dermis bilden dermale Fibroblasten, die in der Lage sind, Kollagen und Elastin zu sekretieren (Wolff, 2009). Weiterhin enthält die

Dermis Zellen zur Immunabwehr (Mastzellen, Histozyten), die v.a. bei allergischen Reaktionen der Haut eine entscheidende Rolle spielen (Lai-Cheong & Mc Grath, 2009). Schließlich enthält die Dermis ein Netzwerk aus Blutgefäßen, Nervenfasern sowie Hautanhangsgebilden, wie die Haarfollikel und Schweißdrüsen (Jablonski, 2004). Die Schweißdrüsen befinden sich an der Grenze zur Subkutis (Bovell, 2015).

Die Subkutis besteht hauptsächlich aus Adipozyten (Fettzellen), die der Isolation des Körpers und als Fettdepot dienen. Adipozyten sind in Fettläppchen organisiert und werden von faserigen Septen separiert. Im nicht-adipösen (nicht-fettleibigen) menschlichen Körper befinden sich ca. 80 % des gesamten Körperfetts in der Subkutis (Lai-Cheong & Mc Grath, 2009).

## 1.2 Humane Schweißdrüsen

Der Mensch besitzt zwei Typen von exokrinen Schweißdrüsen (*Glandula sudoriferae*). Beide gehören, wie der Haarfollikel oder die Talgdrüse, zu den Hautanhangsgebilden. Diese lassen sich in ekkrine und apokrine Schweißdrüsen unterteilen und wurden im Jahre 1922 von Schiefferdecker klassifiziert (Schiefferdecker, 1922). Die Unterscheidung der Schweißdrüsen-Subtypen beruht auf unterschiedlichen Charakteristika dieser Hautdrüsen (Tab. 1), jedoch wird in beiden Fällen die merokrine Sekretion angenommen. Dabei verläuft die merokrine Sekretion ohne die Schädigung der sezernierenden Zellen während des Sekretionsprozesses (Noel *et al.*, 2012). Aufgrund der kontroversen Ansichten zur Charakterisierung nach der Sekretionsart der Schweißdrüsen-Typen wurde von einigen Forschern eine weitere Klassifizierung vorgeschlagen. Danach wird zwischen epitrichialer (in den Haarfollikel mündend) und atrichialer (in die Hautoberfläche mündend) Morphologie unterschieden (Montgomery *et al.*, 1984; Sato *et al.*, 1989). Ein dritter Subtyp der Schweißdrüse, die apoekkrine Schweißdrüse, wurde im Jahre 1987 von Sato *et al.* als Mischform der zuvor aufgeführten Drüsenarten beschrieben. Diese Drüse soll eine wesentlich höhere Schweißrate als die ekkrine Drüse besitzen (Sato *et al.*, 1987; Sato & Sato, 1987b). Die Existenz der apoekkrinen Drüse wird allerdings kontrovers diskutiert (Bovell *et al.*, 2007). Hier soll daher nicht näher auf diese Drüsenart eingegangen werden.

Der wesentliche Unterschied der apokrinen und ekkrinen Schweißdrüsen liegt in ihrer Funktion. Die apokrine Drüse, welche auch als Duftdrüse bezeichnet wird, ist hauptsächlich für die Duft- und Pheromonproduktion verantwortlich (Sato *et al.*, 1987; Zeng *et al.*, 1992), wohingegen die ekkrine Schweißdrüse ihre Hauptfunktion in der Regulation der Körpertemperatur innehat (Noel *et al.*, 2012; Quinton, 1983; Sato *et al.*, 1989). Tabelle 1 fasst grundlegende Charakteristika der ekkrinen und apokrinen Schweißdrüsen zusammen, die nach Hurley und Wilke *et al.* modifiziert wurden (Hurley, 2001; Wilke *et al.*, 2007). Beide Subtypen der Schweißdrüse unterscheiden sich stark voneinander, sowohl hinsichtlich Lokalisation als auch Anzahl, sekretiertem Schweiß, Morphologie und Funktion. In den Abschnitten 1.3.1 ff. werden die charakteristischen Merkmale der Subtypen der humanen Schweißdrüsen beschrieben.

**Tabelle 1: Charakteristika der ekkrinen und apokrinen Schweißdrüse.** Modifiziert nach Hurley und Wilke *et al.* (Hurley, 2001; Wilke *et al.*, 2007).

Parameter	Ekkrine Schweißdrüse	Apokrine Schweißdrüse
Funktion	Thermoregulation	Geruchs-/Pheromonbildung
Vorkommen	Gesamte Hautoberfläche (Mensch, Affen, Sohlen von Katzen, Hunde und Nager, Rüsselscheibe des Schweins), Ausnahmen: Lippen, <i>Klitoris</i> , <i>Glans penis</i>	Beim Menschen limitiert auf Achsel, Brustwarzen, perigenitale und perianale Regionen (bei allen Säugetieren)
Anzahl	Ca. 1,6-5 Millionen	Ca. 100.000
Größe	0,05 (Dukt) - 0,1 mm (Coil) im Durchmesser	> 800 µm im Durchmesser (Coil)
Anatomische Struktur	Sezernierendes Endstück (Coil), ausführender dermaler Dukt und intraepidermaler Dukt (Acrosyngium)	Apokrines Endstück (Coil) und apokriner Dukt
Mündung	atrichial (in die Hautoberfläche mündend)	epitrichial (im Haarfollikel mündend)
Funktionalität	Funktional ab der Embryonalentwicklung	Mit Beginn der Pubertät (beim Menschen)
Innervation	Hauptsächlich cholinerg (z.B. ACh)	Hauptsächlich adrenerg (z.B. Epinephrin, Norepinephrin)
Sezernierende Zellen	1 Zellschicht (Anteil je ca. 50 %) mit sezernierenden basalen (helle, seröse, <i>clear</i> ) Zellen und apikalen (luminale, muköse, <i>dark</i> ) Zellen mit intrazellulären Canaluci	Zellschicht flach bis hochprismatische sezernierende Zellen (bei Sekretion Vergrößerung der Zellen)
Myoepithelium im Coil	Umgeben sezernierende Zellen	Umgeben sezernierende Zellen, dichter gelagert als in ekkrinen Drüsen
Dukt	Zweischichtiges kubisches Epithel	Zweischichtiges kubisches Epithel
Sekretion: a) Menge b) Zusammensetzung c) pH-Wert	a) bis zu 4 l/h b) hypotones Sekret (98-99 % Wasser, Salze, Harnsäure, Lactat, Proteine und Peptide, z.B. Dermcidin, keine Lipide) c) pH 4–6,8	a) sehr geringe Mengen b) viskos, milchig, beinhaltet Lipide, Stickstoff, Lactat, Magnesium, Hydrogencarbonat, Pheromone c) pH 6–7,5

### **1.2.1 Die apokrine Schweißdrüse**

Apokrine Schweißdrüsen sind für die Geruchsbildung und daher für den Körpergeruch verantwortlich, münden in den Haarfollikel (epitrichial) und sind wesentlich größer als ekkrine Schweißdrüsen (siehe Tab. 1). Sie sind bereits ab der Geburt eines Menschen vorhanden, jedoch setzt ihre Aktivität erst mit der Pubertät ein. Des Weiteren sind apokrine Schweißdrüsen nur auf behaarte Körperregionen beschränkt; darunter die Achselregion, Brustwarzen, perineale und genitale Bereiche. Morphologisch ist der grundlegende Aufbau mit dem der ekkrinen Schweißdrüsen vergleichbar (Quinton *et al.*, 1999). Sie besitzen ein geknäueltes sezernierendes Coil und einen Ausführungsgang, den Dukt. Das Coil besteht aus zwei Zelltypen und setzt sich aus sezernierenden Zellen sowie Myoepithelzellen zusammen. Die sezernierenden Zellen werden auch als Sekretzellen bezeichnet und von Myoepithelzellen umgeben. Der im Haarfollikel mündende epitrichiale Dukt ist sehr kurz und aus einem zweischichtigen Epithel aufgebaut (Wilke *et al.*, 2007). Apokrine Schweißdrüsen reagieren unter adrenerger Stimulation via Adrenalin oder Noradrenalin auf emotionale Reize, wie beispielsweise Angst, Schmerzen oder sexuelle Erregung. Die sekretierte Flüssigkeit hat einen pH-Wert von 6-7,5 (Draeos, 2001). Sie ist ölig, geruchlos und beinhaltet Lipide sowie Steroide. Nach Stoffwechselaktivitäten auf der Hautoberfläche durch Mikroorganismen kommt es zur Geruchsbildung (Wilke *et al.*, 2007). Da der Fokus auf den ekkrinen Schweißdrüsen liegt, wird an dieser Stelle nicht weiter auf die apokrine Schweißdrüse eingegangen.

### **1.2.2 Die ekkrine Schweißdrüse**

#### **1.2.2.1 Morphologie und Funktionen der ekkrinen Schweißdrüse**

Ekkrine Schweißdrüsen kommen beim Menschen mit einer Anzahl von ca. 1,6-5 Millionen nahezu auf der gesamten Körperoberfläche vor. Die durchschnittliche Dichte der ekkrinen Drüsen beträgt ca. 200/cm<sup>2</sup>, jedoch variiert sie je nach Körperregion und erreicht mit bis zu 600-700/cm<sup>2</sup> an plantaren sowie palmaren Körperregionen ihr Maximum (Wilke *et al.*, 2007). Durch die Verdunstung des Schweißes kommt es zur effizienten Kühlung der Haut. Dieser Prozess wird auch als evaporative Wärmeabgabe oder als Evaporation bezeichnet (Nieß, 2010). Ekkrine Drüsen gehören zu den unverzweigten gewundenen (tubulären) Drüsen und besitzen eine Gesamtlänge von ca. 4-8 mm (Quinton *et al.*, 1999; Wilke *et al.*, 2007). Sie sind schon nach der Geburt vollständig entwickelt sowie funktionsfähig und werden hauptsächlich cholinerg über

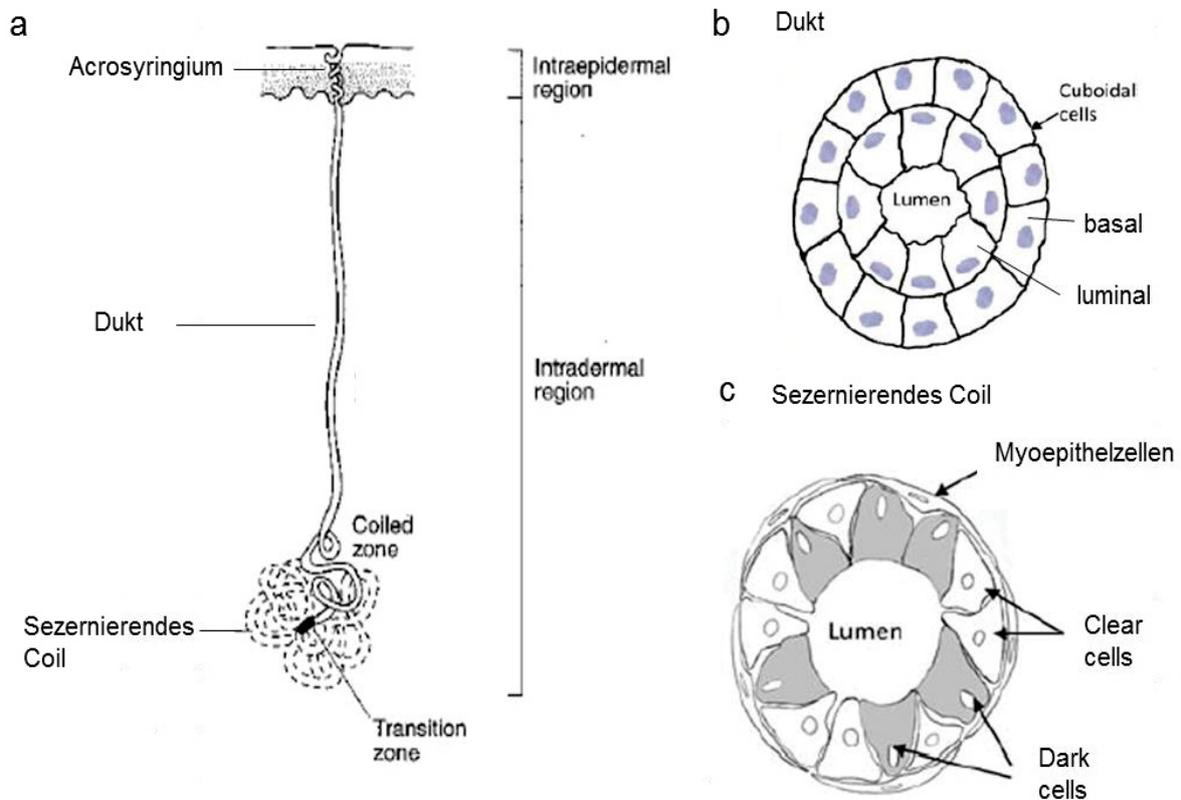
ACh innerviert (Sato *et al.*, 1989). Im Vergleich zur apokrinen Drüse besteht die relativ kleine, ekkrine Drüse morphologisch aus dem sezernierenden Endstück (Coil), dem resorbierenden Ausführungsgang (Dukt) und dem intraepidermalen Dukt (Acrosyringium) (Hurley, 2001).

Der Dukt wird in das gewundene Segment, das gerade verlaufende Segment und das Acrosyringium unterteilt. Der Ausführungsgang durchdringt die Epidermis sowie die Dermis bis es zum Übergang in das Coil (Transitionszone) kommt. Zur Abgabe des Schweißes dient das an der Hautoberfläche mündende Acrosyringium. Die intradermalen Dukt-bildenden Zellen gehen spiralförmig in das intraepidermale Acrosyringium über (Achenbach, 2004). Dabei besteht der Dukt aus einem zwei- bis drei-schichtigen kubischen Epithel (Hibbs, 1958; Montgomery *et al.*, 1985). Der Dukt hat die Aufgabe, insbesondere Natriumchlorid (NaCl), zur Minimierung des Salzverlustes aus dem Schweiß zu resorbieren (Bijman & Quinton, 1984). Die Zellschichten des Duktes setzen sich aus basalen (vom Lumen abgewandt) und luminalen (apikale, zum Lumen gewandte) Zellen zusammen (Cui & Schlessinger, 2015), welche einen durchschnittlichen (äußeren) Durchmesser von ca. 50-80  $\mu\text{m}$  besitzen (Wilke *et al.*, 2007).

Das sezernierende Coil befindet sich an der Grenze zwischen retikulärer Dermis und Subkutis. Der Durchmesser des gesamten Coils beträgt ca. 500-700  $\mu\text{m}$ , welches aus einem einzelnen gewundenen Tubulus mit einem Durchmesser von ca. 60-120  $\mu\text{m}$  besteht (Wilke *et al.*, 2007). Dieser ist aus drei unterschiedlichen, funktionalen Zelltypen – *clear cells*, *dark cells* und Myoepithelzellen – relativ komplex aufgebaut. Nach bisherigen Erkenntnissen weist der Tubulus des Coils dabei ein einschichtiges Epithel von ca. 50 % *clear* und 50 % *dark cells* auf (Bovell, 2015). Die sezernierenden Zellen werden von einer Zellschicht Myoepithelzellen umgeben. Diese flachen, elongierten Zellen wurden nur im Coil nachgewiesen, die das Bindegewebe mit einer Basalmembran stark nach außen abgrenzen. Mikroskopisch erscheinen sie als Zellen der glatten Herzmuskulatur und exprimieren smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (Kurata *et al.*, 2014).

Außerdem besitzen sie bei Stimulation und dem demzufolge entstehenden hydrostatischen Gradienten die Fähigkeit zu kontrahieren, um den ekkrinen Schweiß auszupressen und das Coil zu stützen (Achenbach, 2004; Saga, 2002; Sato *et al.*,

1991). Aufgrund dessen wird der Strukturerhalt als Hauptfunktion der Myoepithelzellen angenommen (Quinton *et al.*, 1999).



**Abbildung 2: Morphologie der ekkrinen Schweißdrüse.** a) Der Aufbau der ekkrinen Schweißdrüse in der Humanhaut lässt sich in Acrosyringium, Dukt und sezernierendes Coil unterteilen. b) Der resorbierende Dukt im Querschnitt mit einem zweischichtigen kubischen Epithel aus basalen und apikalen (luminalen) Zellen. c) Das sezernierende Coil besteht aus 3 Zelltypen (Myoepithelzellen, *dark* und *clear cells*). Veränderte Abbildung nach (Bovell, 2015; Quinton *et al.*, 1999).

Aufgrund des histologischen Bildes des Coils nach Färbung mit den Farbstoffen Eosin, Toluidinblau und Methylenblau und der Visualisierung auf ultrastruktureller Ebene wurden die dunkel erscheinenden Zellen als *dark cells* bzw. die heller gefärbten Zellen als *clear cells* bezeichnet. Dies ist auf die Vielzahl der osmiophilen Granula der *dark cells*, die auch als muköse Zellen bezeichnet werden, zurückzuführen. Es unterscheidet sie dadurch von den *clear cells*, die weniger Granula enthalten und eher an der Sekretion von hauptsächlich NaCl im Primärschweiß involviert sind. Die *clear cells* wurden bisher eingehend auf ihre Funktionalität untersucht und charakterisiert, wohingegen die Funktion der *dark cells* noch weitgehend unbekannt ist. Bei der Schweißsekretion wird ein Teil der luminalen Granula der *dark cells* freigesetzt (Bovell,

2015). Vermutlich sind die *dark cells* bei der Freisetzung antimikrobieller Proteine, wie Dermcidin und Sialomucin, beteiligt (Cui & Schlessinger, 2015).

Von Kurata *et al.* konnte multipotentes Stammzellpotential der Myoepithelzellen identifiziert werden (Kurata *et al.*, 2014). Insgesamt tragen Zellen des Coils und des Dukts zu Wundheilungsprozessen sowie der Homöostase der Haut bei und besitzen neben Keratinozyten die Fähigkeit, eine verhornte Epidermis zu rekonstruieren (Biedermann *et al.*, 2010).

Ekrine Schweißdrüsen haben neben der Thermoregulation, der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Wundheilung die Funktion, antimikrobielle Peptide zu sekretieren, wie beispielsweise Dermcidin und Lactoferrin (Schittek *et al.*, 2001). Weitere Bestandteile des Schweißes, wie Laktat und Urea, sind essentiell für die Homöostase sowie die Befeuchtung der Haut und werden als *Natural moisturizing factors* bezeichnet (Watabe *et al.*, 2013). Der ekkrine hypotone Schweiß mit einem pH-Wert von 4-6,8 (Draelos, 2001) besteht jedoch zu 98-99 % aus Wasser und beinhaltet zudem noch Ionen (Kalium, Natrium, Chlorid, Calcium, Magnesium, und Ammonium) und weitere Komponenten (Bicarbonat, freie Aminosäuren, Harnsäure) (Quinton *et al.*, 1999).

### 1.2.2.2 Entwicklung der ekkrinen Schweißdrüse

Die Entwicklung (Organogenese) der ekkrinen Schweißdrüse beginnt mit dem 3.-4. Monat der Embryonalentwicklung mit der Einstülpung der Epidermis, welche zunächst den Dukt bildet. Die Anlagen der Hautanhangsgebilde gehen aus dem embryonalem Ektoderm hervor. Einwachsende Zellen der Epidermis dringen bis in die Subkutis vor und bilden das sezernierende Coil. Ekrine Schweißdrüsen sind postnatal schon nach 3 Wochen vollständig funktionsfähig (Lu & Fuchs, 2014). Die Entwicklung der ekkrinen Schweißdrüse ist ein komplexer Vorgang, welcher durch diverse Signalling pathways (Wnt, *wingless-type integration site family*; Shh, *sonic hedgehog*; Bmp, *bone morphogenetic protein*; Eda, Ectodisplasin A) zwischen Ektoderm und Mesenchym des Epithelgewebes reguliert wird (Cui *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016). Auch microRNA's (miRNA) haben entscheidende Funktionen bei der Entwicklung der Schweißdrüse (Cui; *et al.*, 2017). Der Wnt-Signalweg dient v.a. der Induktion der Ontogenese (Cui & Schlessinger, 2015). Nichtsdestotrotz ist der Differenzierungsprozess der ekkrinen Schweißdrüsenzellen während der Entwicklung relativ unbekannt (Biedermann *et al.*,

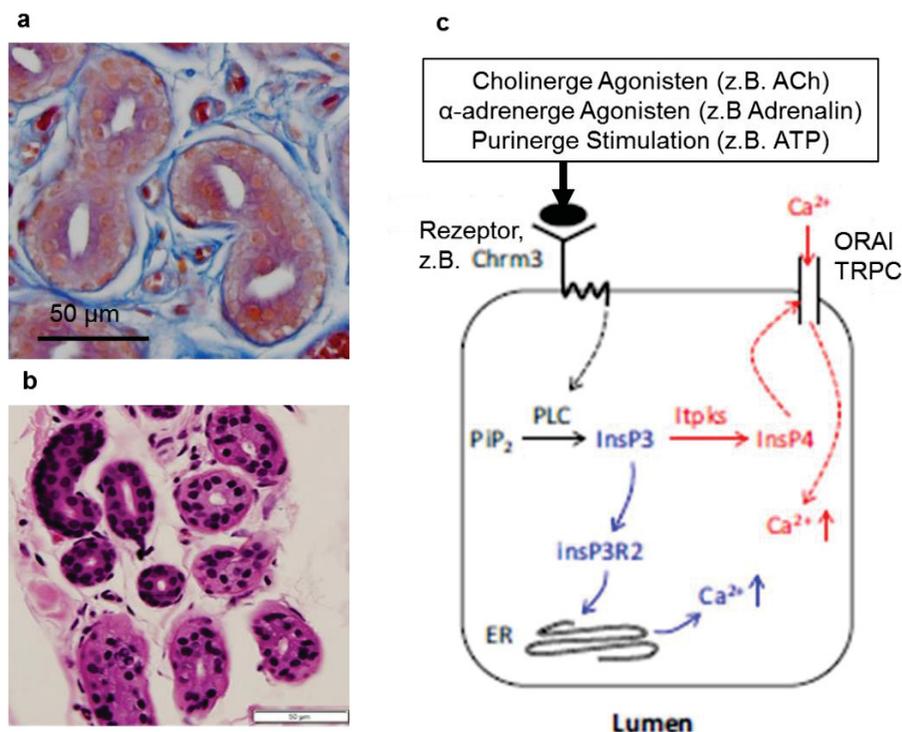
2010). Aus diesem Grund ist die Regeneration der ekkrinen Schweißdrüsen – z.B. nach Verbrennung der Haut und Zerstörung der Drüsen – bisher nicht möglich. Die Erforschung dieser regenerativen Prozesse rückt jedoch immer mehr in den Fokus aktueller Studien (Huang *et al.*, 2016).

### 1.2.2.3 Regulation der Körpertemperatur in der ekkrinen Schweißdrüse

Die Regulation der Körpertemperatur ist für das Überleben des Menschen fundamental, da eine konstant erhöhte Temperatur des Körpers ( $> 40^{\circ}\text{C}$ ) zur Proteindenaturierung, zu Organversagen und schließlich den Tod zur Folge haben kann (Wilke *et al.*, 2007). Daher ist die Thermoregulation bei externen Umweltbedingungen wie Hitze oder unter physiologischem Stress von größter Bedeutung (Sato *et al.*, 1989). Über gustatorische Stimuli, insbesondere nach dem Verzehr von scharfen Speisen (Lee, 1954), oder über emotionale Stimuli (Stress, Angst, Schmerzen) (Chalmers & Keele, 1952) kann es ebenfalls zur Aktivierung von neuronalen Zentren des ZNS und anschließend zur Schweißsekretion kommen (Hurley, 2001; Noel *et al.*, 2012). Die zentrale Steuerung dieser beiden, eher nebensächlichen Stimuli der ekkrinen Sekretion ist zum Teil noch nicht aufgeklärt, insbesondere die des emotionalen Schwitzens (Wilke *et al.*, 2007).

Insgesamt kann die ekkrine Schweißdrüse von diversen Mediatoren sowie über unterschiedliche Signalwege stimuliert werden. Die cholinerge Innervierung via ACh wird dabei als diejenige angesehen, die *in vivo* zur höchsten Schweißrate führt (Cui & Schlessinger, 2015). Daneben spielen auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Mediatoren (Adrenalin, Noradrenalin) eine wichtige Rolle bei der Stimulation von ekkrinen Schweißdrüsen (Hurley, 2001; Sato *et al.*, 1989). Dabei hat Calcium als intrazellulärer Botenstoff (*second messenger*) entscheidende Funktionen bei der cholinergen und  $\alpha$ -adrenergen Stimulation, jedoch nicht bei der  $\beta$ -adrenergen, die über den Neurotransmitter zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) verläuft. Die beiden Botenstoffe Calcium und cAMP unterscheiden sich außerdem in ihrem Reaktionsvermögen und ihrer Wirkung. Bei Anstieg des intrazellulären Calciums kommt es zu einer schnelleren Reaktion im Vergleich zur cAMP-Reaktion. Letztere verläuft langsamer, erzielt jedoch eine längere Wirkung. Dennoch werden beide als synergetisch angesehen (Bovell, 2015; Sato & Sato, 1983).

Neben diesen Mediatoren können weitere Substanzen die Schweißsekretion in sezernierenden und auch in dukталen Zellen beeinflussen. Dazu gehören u.a. purinerge Stimulanzen (Adenosintriphosphat, ATP; Uridintriphosphat, UTP) (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014), das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) (Sato & Sato, 1987a), sowie die Neuropeptide Galanin (Bovell *et al.*, 2013), *Calcitonin-gene related peptide* (CGRP) (Cui & Schlessinger, 2015) und Substance P (Vilches *et al.*, 2012; Zancanaro *et al.*, 1999). Diese lösen intrazellulär nach Bindung an deren spezifischen Rezeptoren eine komplexe Serie biochemischer Signalprozesse aus, die entweder über Calcium oder über cAMP als *second messenger* reguliert werden. Dies kann zur Stimulation oder auch zur Inhibition der Sekretion führen. Des Weiteren kann z.B. VIP die Chlorid-Rückresorption im Dukt regulieren (Vilches *et al.*, 2012).



**Abbildung 3: Ca<sup>2+</sup>-Signalling in Zellen des sezernierenden Coils.** a+b) Azan- und HE-gefärbter Gewebeschnitt ekkriner Schweißdrüsen im Querschnitt. Maßstab 50 µm. c) Ca<sup>2+</sup>-Signalling in einer sezernierenden Zelle des Coils. Agonisten binden an Rezeptoren, lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die den Ca<sup>2+</sup>-Influx über z.B. ORAI oder TRPC bewirkt. Modifizierte Abbildung in c) nach (Cui & Schlessinger, 2015).

Die Aktivität der ekkrinen Schweißdrüse wird typischerweise über postganglionäre sympathische, cholinerge Fasern des zentralen Nervensystems (ZNS) gesteuert (Uno, 1977), die den Neurotransmitter ACh ausschütten (Saint-Criq & Gray, 2017; Sato *et al.*, 1989). Bei Freisetzung kommt es zur Bindung von ACh an nikotinische (nAChR)

sowie an muskarine/muskarinische (mAChR) Rezeptoren. ACh wird von der Acetylcholin-Esterase (AChE), die im menschlichen Körper eines der meist vorkommenden Enzyme darstellt (Kurzen *et al.*, 2004), in Acetat und stabiles Cholin gespalten (Turner *et al.*, 2013). Während der Stimulation kommt es zur Aktivierung von v.a. muskarinen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Dabei wird vorwiegend der muskarine ACh-Rezeptor M3 (CHRM3) aktiviert (Landis, 1999). CHRM3 kommt in sezernierenden Zellen und Myoepithelzellen des sezernierenden Coils vor (Cui & Schlessinger, 2015; Kurzen *et al.*, 2004). Nach Freisetzung von cholinergen Agonisten, wie ACh, und der Bindung an CHRM3 kommt es zur Aktivierung des intrazellulären, Membran-gebundenen Enzyms Phospholipase C (PLC). Anschließend wird Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) im Zytosol der Zelle gebildet, das wiederum an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) bindet. Im nächsten Schritt wird Ca<sup>2+</sup> aus dem ER in das Zytoplasma freigesetzt. Zudem werden Calciumkanäle der basolateralen Membran geöffnet, sodass es auch zum Influx von Ca<sup>2+</sup> aus dem extrazellulären Zellzwischenraum (Interstitium) in das Zytoplasma kommt. Bei Entfernung von Ca<sup>2+</sup> aus dem extrazellulären Zwischenraum konnte die Schweißsekretion *in vitro* signifikant reduziert werden. Jedoch ist die Funktionalität der involvierten Kanäle noch nicht aufgeklärt.

Weiterhin ist auch der K<sup>+</sup>- und der Cl<sup>-</sup>-Efflux von entscheidender Bedeutung (Cui & Schlessinger, 2015). Die genauen Abläufe der ekkrinen Sekretion und die Beteiligung einzelner spezifischer Ionenkanäle wird in Abschnitt 1.3.2.4 behandelt.

Der cAMP-gesteuerte Signalweg spielt hingegen eine untergeordnete Rolle bei der ekkrinen Sekretion, da es *in vivo* und *in vitro* hauptsächlich über die cholinerge Stimulation zur Sekretion kommt. Über cAMP wird die  $\beta$ -adrenerge Stimulation gesteuert, die nach Bindung von adrenergen Agonisten an GPCR's intrazellulär zur Signalkaskade führen. Das Enzym Adenylatzyklase katalysiert dabei die Reaktion von ATP zu cAMP. Dieser *second messenger* diffundiert in das Zytoplasma der Zelle. Es kommt anschließend zur Öffnung unterschiedlicher Kanäle in der luminalen Membran, v.a. cAMP-abhängiger Chlorid-Kanäle (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) (Saint-Criq & Gray, 2017).

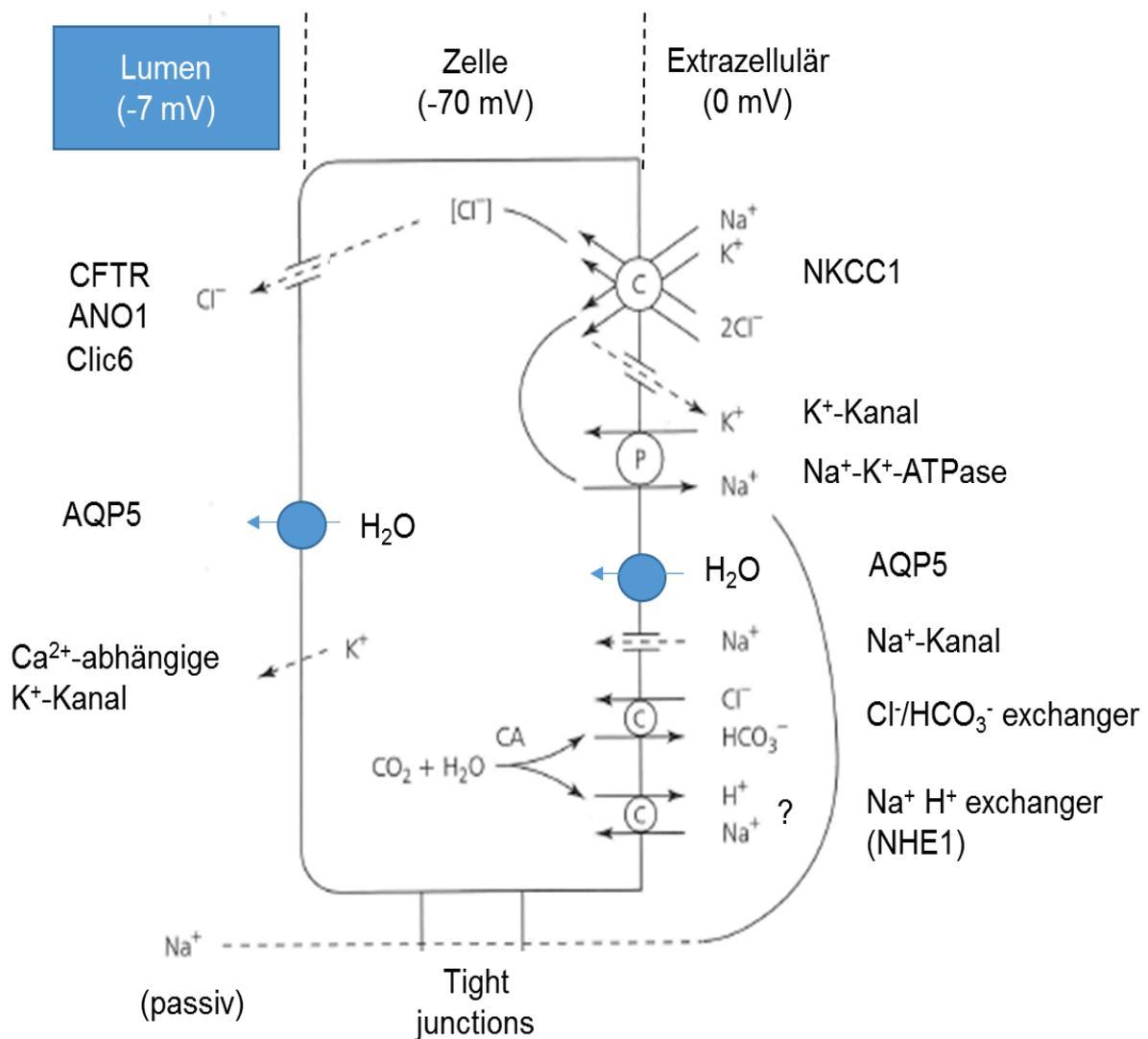
#### 1.2.2.4 Ekkriner Sekretionsmechanismus

Der Sekretionsmechanismus in ekkrinen Schweißdrüsen ist komplex und dynamisch (Abb. 4). In diesem Prozess sind eine Vielzahl von Ionenkanälen, Transporter und Pumpen involviert. Dabei spielen v.a. die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransporter 1 (NKCC1),  $\text{K}^+$ -Kanäle,  $\text{Cl}^-$ -Kanäle und der Wasserkanal Aquaporin 5 (AQP5) eine bedeutende Rolle (Bovell, 2015; Cui & Schlessinger, 2015; Nejsum *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 1999; Saint-Criq & Gray, 2017; Zhang *et al.*, 2014).

Die ekkrine Sekretion ist abhängig von einem elektrochemischen Gradienten, der als treibende Kraft der Sekretion beschrieben wird. Die ubiquitäre  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  trägt zum Erhalt dieses osmotischen Gradienten bei. Sie befördert unter ATP-Verbrauch und entgegen dem Konzentrationsgefälle  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle und  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle. Die  $\text{K}^+$ -Ionen fließen mit ihrem Gradienten wieder aus der Zelle, sodass die  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Zelle im Vergleich zum Extrazellularraum gering ist. Dieser elektrochemische  $\text{Na}^+$ -Gradient wird bei der Stimulation und der Sekretion von insbesondere NKCC1 ausgenutzt. Der gesamte Prozess zur Errichtung des Gradienten ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Wilke *et al.*, 2007), wie beispielsweise die Funktion des  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  *exchanger* 1 (NHE1)-Kanals (Bovell, 2015). Der ekkrine Sekretionsmechanismus wird auch mit dem Begriff „ $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$  cotransporter model“ beschrieben, welcher neben der Sekretion in der ekkrinen Schweißdrüse auch die Sekretionsprozesse im Pankreas und in der Speicheldrüse betrifft (Cui & Schlessinger, 2015; Quinton, 1983).

Bei der  $\alpha$ -adrenergen und cholinergen Stimulation kommt es, wie zuvor in 1.3.2.3 beschrieben, zum Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Anschließend werden basolateral  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle aktiviert, sodass es zum  $\text{K}^+$ -Efflux (Ausstrom) mit dem  $\text{K}^+$ -Gradienten in das Interstitium kommt. An diesem Prozess ist beispielweise der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$ -Kanal (Kcnn4) beteiligt. Gleichzeitig werden apikal  $\text{Cl}^-$ -Ionen aus der Zelle in das Lumen des Coils befördert. Der  $\text{KCl}$ -Ausstrom aktiviert dann den NKCC1-Cotransporter, welcher  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -, und  $\text{Cl}^-$ -Ionen elektroneutral wieder in die Zelle befördert. Durch den intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Anstieg wird die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  aktiviert und  $\text{Na}^+$  wieder aus der Zelle transportiert, um den Gradienten aufrechtzuerhalten. Die  $\text{K}^+$ -Ionen werden durch basolaterale  $\text{K}^+$ -Kanäle ebenfalls aus der Zelle transportiert, sodass intrazellulär  $\text{Cl}^-$ -Ionen akkumulieren. Neben NKCC1 sind auch weitere Kanäle an der  $\text{Cl}^-$ -Akkumulation in der Zelle beteiligt, wie beispielsweise der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

*exchanger* (Louie *et al.*, 2016). Insgesamt führt dies zur negativen Ladung der Zelle (Hurley, 2001). Sodann diffundieren Cl<sup>-</sup>-Ionen in das Lumen, wie beispielsweise durch den cAMP-regulierten Anionenkanal CFTR, den *Chloride Intracellular Channel* (Clic6) und den Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Cl-Kanal (CaCC) Anoctamin 1 (ANO1) (Saint-Criq & Gray, 2017). Die Zelle depolarisiert bei diesem Prozess, d.h. das Potenzial in der Zelle wird positiver. Das Lumen des Coils wird mit dem Cl<sup>-</sup>-Ausstrom jedoch negativer.



**Abbildung 4: Sekretionsmechanismus in sezernierenden Zellen des Coils.** Nach cholinergem und  $\alpha$ -adrenerger Stimulation werden über den Ca<sup>2+</sup>-Signalweg bestimmte Ionenkanäle, wie die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Cotransporter 1 (NKCC1), K<sup>+</sup>-Kanäle (z.B. Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle), Cl<sup>-</sup>-Kanäle (ANO1, CFTR, Clic6) und der Wasserkanal Aquaporin 5 (AQP5) getriggert. Diese tragen hauptsächlich zur Sekretion des Primärschweißes bei. Eine Beteiligung des Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschers an der Chlorid-Akkumulation und evtl. NHE1 am Na<sup>+</sup>-Gradienten wird vermutet. Die Ausrichtung des NHE1-Kanals ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Passiver parazellulärer Na<sup>+</sup>-Ionenfluss über *Tight Junctions*. Abbildung modifiziert nach Hurley (Hurley, 2001).

Zum Ausgleich des neg. Potenzials im Lumen strömen  $\text{Na}^+$ -Ionen über Zell-Zell-Verbindungen (z.B. *Tight Junctions*) des Interstitiums oder über interzelluläre Canaliculi passiv nach. Durch das negative Potenzial wird auch Wasser transepithelial über AQP5 osmotisch nachgezogen (Nejsum *et al.*, 2002), sodass hypotonischer Primärschweiß entsteht.

Hingegen kommt es bei der  $\beta$ -adrenergen Stimulation zum intrazellulären Anstieg von cAMP, was ebenfalls die Öffnung des luminalen CFTR-Kanals zur Folge hat. Dies resultiert im  $\text{Cl}^-$ -Efflux, wodurch das Lumen zunehmend negativ aufgeladen wird. Aufgrund der negativen Ladung und des osmotischen Gradienten fließen auch dort  $\text{Na}^+$ -Ionen und Wasser in das Lumen nach und erzeugen Primärschweiß (Quinton *et al.*, 1999).

Nach der cholinergen oder adrenergen Stimulation und der Bildung des isotonischen Primärschweißes im Coil kommt es zur Modifizierung des Schweißes im resorbierenden Dukt. Zunächst hat der gebildete Schweiß im Coil mit ca. 145 mM  $\text{Na}^+$  und 115 mM  $\text{Cl}^-$  einen relativ hohen Salzgehalt. Dieser kann jedoch nach Rückresorption im Dukt wieder auf ca. 50 mM NaCl fallen. Bei diesem Prozess wird zwar NaCl, nicht aber Wasser resorbiert, was den finalen, hypotonen Schweiß bildet, der an die Hautoberfläche abgegeben wird. Die Zellen des Duktetes mit je einer Schicht aus basalen und luminalen Zellen werden durch *Gap Junctions* sowie Desmosomen zusammengehalten (Saint-Criq & Gray, 2017). Sie bilden eine funktionale Einheit, ein sog. Syncytium (Hibbs, 1958).

Zur transzellulären Rückresorption von NaCl dienen spezifische Ionenkanäle der Dukt-bildenden Zellen. CFTR wird in Dukt-Zellen sowohl apikal als auch basolateral exprimiert (Saint-Criq & Gray, 2017). Dieser cAMP-regulierte und ATP-bindende  $\text{Cl}^-$ -Kanal (Hwang & Kirk, 2013) interagiert mit dem epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal ENaC (*epithelial sodium channel*, Amilorid-sensitiver Kanal). ENaC resorbiert luminal aktiv  $\text{Na}^+$ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle. Mithilfe der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase wird  $\text{Na}^+$  dann wieder aus der Zelle in das Interstitium befördert. So entsteht erneut ein transepithelialer Gradient, der passiv  $\text{Cl}^-$ -Ionen via CFTR nach sich zieht und aus dem Lumen in den Zellzwischenraum befördert. Außerdem wird die Beteiligung weiterer resorbierender Kanäle in der apikalen Membran, wie beispielsweise des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  *exchanger* sowie der Protonen-V-Typ-ATPase, vermutet.

Die Dukt-Zellen besitzen eine geringe Wasser-Permeabilität (Saint-Criq & Gray, 2017), sodass nur Salz-Ionen im Dukt rückresorbiert werden und der zu 98-99 % aus Wasser bestehende Schweiß (Draelos, 2001) an die Haut geleitet wird. Somit wird der menschliche Körper vor enormen Salzverlust geschützt (Saint-Criq & Gray, 2017).

#### **1.2.2.5 Erkrankungen der ekkrinen Schweißdrüse**

Beim Menschen sind verschiedene Erkrankungen der Schweißdrüse bekannt. Dazu zählen die Hyperhidrose, Bromhidrose, Hypohidrose, Anhidrose und die Chromhidrose (Noel *et al.*, 2012). Außerdem sind weitere Krankheiten diagnostiziert, die mit der Schweißsekretion assoziiert sind und indirekte Auswirkungen auf die Physiologie der Schweißdrüse haben. Dazu zählt u.a. die potenziell letale Erkrankung der zystischen Fibrose (ZF) (Bovell, 2015).

An Hyperhidrose leidende Menschen haben mit übermäßigem Schwitzen zu kämpfen, was v.a. in bestimmten Körperregionen, wie den Handinnenflächen, den Fußsohlen, dem Gesicht und den Achseln, auftritt (Draelos, 2001). Dabei wird der Auslöser der enormen Sekretion nicht der Thermoregulation, sondern dem emotionalen Stress, zugeordnet. Hyperhidrose kann durch gezieltes Spritzen von Botulinum Toxin A („Botox“) in die betroffenen Areale oder durch Entfernen der Schweißdrüsen behandelt werden (Kreyden & Scheidegger, 2004). Weiterhin können sog. Anticholinergika, wie z.B. Glykopyrrolat (Glykopyrroniumbromid), zur Inhibition der cholinergen Stimulation eingesetzt werden (Namba *et al.*, 2017). Die übermäßige Schweißproduktion bei der Hyperhidrose ist aufgrund der enormen Schweißmenge auf der Haut und der bakteriellen Degradation mit unangenehmen Körpergeruch verbunden. Der Nebeneffekt des verstärkten Körpergeruchs wird als Bromhidrose bezeichnet (Noel *et al.*, 2012).

Hypohidrose und Anhidrose bezeichnen Krankheiten mit gestörter reduzierter bzw. defizienter Schweißproduktion der ekkrinen Schweißdrüsen, die unter bestimmten klimatischen Bedingungen für den Menschen aufgrund von Überhitzung lebensbedrohlich sein können. Weiterhin sind mit der Anhidrose auch eine Vielzahl von Hautkrankheiten, wie z.B. das Sjögren-Syndrom, verbunden (Noel *et al.*, 2012). In ersten Studien wurde gezeigt, dass NKCC1, der Master-Regulator *forkhead transcription factor* (FoxA1) und der Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Anionen-Kanal Bestrophin 2 (Best2) mit der Regulation der Sekretion und mit Anhidrose in Verbindung gebracht

werden können. FoxA1 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der nur in *dark cells* vorkommt und den Cotransporter NKCC1 reguliert. Der ebenfalls *dark cell*-spezifische, vermutlich HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-transportierende Kanal Best2 hat eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Sekretion (Cui *et al.*, 2012). Die Funktion von FoxA1 und Best2 wurde in Mäusen analysiert. In FoxA1-deletierten Mäusen wurde Anhidrose festgestellt, wohingegen in Best2-deletierten Mäusen nur eine verringerte Sekretion (Hypohidrose) beobachtet wurde. Weiterhin geht die Anhidrose mit einer Mucin-/Glykoprotein-Akkumulation im Coil-Lumen und im Dukt-Lumen einher. Beide Proteine werden normalerweise mit dem Schweiß „ausgewaschen“ (Cui & Schlessinger, 2015). In neuesten Studien konnte die Beteiligung eines weiteren Transkriptionsfaktors (FoxC1) in Dukt-Zellen gezeigt werden. FoxC1-deletierte Mäuse weisen ebenfalls Anhidrose auf (Cui *et al.*, 2017).

Eine weitere bekannte Krankheit ist die Chromhidrose. Diese beschreibt die Sekretion von abnormal gefärbtem Schweiß und kommt äußerst selten vor, sodass sie hier auch nicht weiter beschrieben wird.

Die zystische Fibrose (*cystic fibrosis*, ZF) stellt eine Lungenkrankheit dar und wird durch Mutationen im CFTR-Gen hervorgerufen. Das CFTR-Gen codiert einen Anionenkanal in Epithelgeweben und ist essenziell für den Flüssigkeitstransport sowie die Elektrolyt-Homöostase (Rückresorption). Beim Menschen äußert sich die Krankheit besonders in der Bildung von zähflüssigem Schleim in den Bronchien, der nur schwer abtransportiert werden kann. Der Verlauf der Krankheit ist unterschiedlich und individuell (Dekkers *et al.*, 2013). Außerdem ist der Schweiß der Erkrankten aufgrund der Fehlfunktion des apikalen CFTR-Chloridkanals im Dukt der ekkrinen Schweißdrüse besonders salzig. Es kommt somit zum massiven Ionenverlust (Hanukoglu *et al.*, 2017).

### 1.3 *In vitro* 2D und 3D Zellkultursysteme der ekkrinen Schweißdrüse

Die Kultivierung von Zellen einer Gewebeart außerhalb des Organismus (*in vitro*) wird als Zellkultur bezeichnet. Es existieren sowohl zweidimensionale (2D) als auch dreidimensionale (3D) *in vitro* Modelle. Dabei werden entweder stabile Zelllinien oder primäre Zellen, welche durch die Dissoziation eines Gewebes gewonnen werden, verwendet. Die 3D Modelle werden zur Aufklärung verschiedener Fragestellungen, wie Erkrankungen, eingesetzt. 3D Modelle gewinnen zunehmend an Bedeutung. Im *tissue engineering* sollen sie etwa als Ersatzgewebe zur Therapie von Krankheiten eingesetzt werden (Schmitz, 2011).

#### 1.3.1 2D Zellkultursysteme der ekkrinen Schweißdrüse

Zur *in vitro* Erforschung der ekkrinen Schweißdrüse wurden bisher insbesondere 2D Kulturen verwendet. Die humane immortalisierte Zelllinie mit dem Namen NCL-SG3 stellt die einzig verfügbare Epithelzelllinie der ekkrinen Schweißdrüse dar und wird als 2D Modellsystem verwendet (Bovell *et al.*, 2008; Ertongur-Fauth *et al.*, 2014; Mork *et al.*, 1996; Ring & Mork, 1997; Ring *et al.*, 1995; Servetnyk & Roomans, 2007). Sie wurde durch die Transfektion von primären Zellkulturen der ekkrinen Schweißdrüse mithilfe des Simian Virus 40 (SV40) hergestellt (Lee & Dessi, 1989). Die Zellen dieser Zelllinie besitzen ultrastrukturelle und einige physiologische Eigenschaften der nativen ekkrinen Drüse. Die genaue Herkunft und die Identität der Zellen konnte bisher noch nicht identifiziert werden, sodass der Zellsubtyp (Myoepithelzellen, *dark cells*, *clear cells*, und/oder Dukt-Zellen) der NCL-SG3 Zelllinie nicht bekannt ist. Es wird vermutet, dass die Zellen sezernierende Funktion besitzen und somit aus dem sezernierenden Coil stammen (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014).

Die Innervierung und das Signalling der Zellen der NCL-SG3 Zelllinie wurden in zahlreichen Studien detailliert beschrieben (Bovell *et al.*, 2009; Lee & Dessi, 1989; Mork *et al.*, 1996; Ring *et al.*, 1995; Servetnyk & Roomans, 2007; Wilson *et al.*, 1994). Purinerge Stimulation (z.B. ATP, UTP) sowie die Stimulation via Neuropeptid Galanin (Bovell *et al.*, 2013) konnte in der Zelllinie ähnlich zur *in vivo* Situation beobachtet werden. Allerdings wurde keine  $\beta$ -adrenerge und keine cholinerge Stimulation via ACh festgestellt. Die ekkrine Sekretion (siehe 1.2.2.3-1.2.2.4) verläuft physiologisch hauptsächlich über die cholinerge Stimulation der ekkrinen Schweißdrüse. Die Zelllinie hat diese Funktion wahrscheinlich in Kultur verloren. In Studien von Sato *et al.* wurde

schon im Jahre 1989 berichtet, dass zum Erhalt der Identitäten und des Differenzierungszustandes der Zellen jeder einzelne Subzelltyp der ekkrinen Drüse *in vitro* essenziell ist. Bei *in vitro* Kultivierung der Zellen kommt es jedoch schnell zum Verlust der morphologischen Eigenschaften (Cui & Schlessinger, 2015; Sato *et al.*, 1989). Weiterhin wurde bei *in vitro* Kultivierung primärer Zellen der gesamten ekkrinen Schweißdrüse oder des sezernierenden Coils festgestellt, dass diese Zellen nach gewisser Zeit in Kultur duktile Eigenschaften annehmen. Es wird vermutet, dass es zur Transformation oder zur De-Differenzierung der Zellen in 2D Kultur kommt (Brayden *et al.*, 1988; Cuthbert *et al.*, 1990).

Nichtsdestotrotz konnte die Zelllinie NCL-SG3 für erste *in vitro* Analysen zur ekkrinen Sekretion eingesetzt werden. Genetische sowie epigenetische Funktionen des regulatorischen Netzwerks und grundlegende Themen wie die Entwicklung oder die Erkrankung der Schweißdrüse bleiben größtenteils unverstanden. Eine Hürde für die Erforschung dieser Fragestellungen könnte die Komposition der Zelllinie NCL-SG3 als *in vitro* 2D Zellkulturmodell darstellen (Cui & Schlessinger, 2015), die nicht der organotypischen Physiologie der ekkrinen Schweißdrüse entspricht.

### 1.3.2 Etablierte 3D Modelle der ekkrinen Schweißdrüse

Mit der Entdeckung und der Entwicklung von extrazellulären Matrices wurde die Rekonstruktion von verschiedenen Gewebetypen in der dreidimensionalen (3D) *in vitro* Kultur erheblich beschleunigt. Die weit verbreitete basalmembranartige Matrix, das sog. Matrigel, wurde von einem Sekret der murinen Sarkom-Zelllinie abgeleitet und enthält eine komplexe Mischung von Komponenten (Laminin, Collagen, Proteasen etc.) und Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor*, EGF etc.). Diese Matrices, wie auch Matrigel, werden v.a. zur Erforschung von Zelldifferenzierung, Angiogenese und Tumorwachstum genutzt (Kleinman & Martin, 2005).

Lei *et al.* und andere Arbeitsgruppen (Huang *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013) verwendeten Matrigel zur Kultivierung von primären ekkrinen Schweißdrüsenzellen. Einige Zellen bilden *de novo* nach einer definierten Kultivierungszeit einen Hohlraum innerhalb der Sphäre, ein sog. Lumen. Diese tubuläre Morphogenese der in die Matrix eingebetteten Zellen konnte z.T. erst nach Transplantation der Matrigel-Zellkultur in die Maus beobachtet werden (Li *et al.*, 2015). Die Lumen-Formation wird sowohl mit der *in vivo* Epithelfunktion als auch mit

Tumorinvasion und Metastasen in Verbindung gebracht wird (Lei *et al.*, 2011). Die verwendete Matrix stellt somit das sog. *scaffold* (Träger-/Gerüstmaterial) dar. Kurata *et al.* setzten Matrigel ebenfalls zur Analyse des von Schweißdrüsen ausgehenden Stammzellpotenzials ein, indem die Forscher „reine“ primäre Myoepithelzellen der ekkrinen humanen Schweißdrüse in Matrigel kultivierten. Das Selbsterneuerungspotenzial dieses Subzelltyps wurde in dieser Studie mithilfe von epidermalen Stammzellmarkern (CD29, CD49f) untersucht (Kurata *et al.*, 2014). Nagel *et al.* konnten in Zellen des umliegenden Mesenchyms (Stroma) und in ekkrinen Schweißdrüsenzellen multipotenten Stammzellcharakter nachweisen (Nagel *et al.*, 2013). Außerdem berichteten Biedermann *et al.* von der Rekonstruktion der epidermalen Keratinozyten, die auf das Stammzellpotenzial nach Migration von Zellen des Duktus sowie des Coils zurückgeführt wird (Biedermann *et al.*, 2010).

Bei der Kultivierung von embryonalen oder adulten Stammzellen in einer 3D Zellkultur organisieren sich diese Zellen unter bestimmten Bedingungen in differenzierte organoide Strukturen ähnlich zur *in vivo* Situation. Diese Strukturen werden demzufolge auch als „Organoide“ bezeichnet. Zur Etablierung dieser 3D-Zellkulturen wird oftmals Matrigel oder Collagen als Matrix verwendet (Huch & Koo, 2015).

*Scaffold*-freie organotypische *in vitro* 3D Modelle der humanen ekkrinen Schweißdrüse mit physiologischer Funktionalität wurden bisher noch nicht etabliert. Mithilfe der *scaffold*-freien 3D *Hanging drop*-Technologie konnte gezeigt werden, dass Primärzellen oder Zellen einer Zelllinie unterschiedlichen Typs assemblieren und sich unter bestimmten Bedingungen ein differenziertes Zellaggregat, ein sog. Organoid, bildet (Foty, 2011; Frey *et al.*, 2014; Gutierrez *et al.*, 2005; Samuelson & Metzger, 2006; Tsukada *et al.*, 2013).

### 1.3.3 2D Zellkulturen und 3D Modelle im Vergleich

Zur Analyse und Erforschung von grundlegenden Prinzipien – wie der Entwicklung oder der Organogenese eines Zellverbandes im Gewebe, eines Organs oder eines gesamten Organismus – bedarf es geeigneter Zellkulturmodelle, die diese biologischen Systeme reproduzieren. Sie imitieren die *in vivo* Situation und können einige Funktionen des Organs rekapitulieren (Frey *et al.*, 2014; Huch & Koo, 2015). Hingegen sind 2D Kulturen aufgrund des Verlustes von z.B. Zell-Zell-Interaktionen, ECM-Kontakt und Zell-Signalling in ihrer Struktur und Physiologie limitiert. Des

Weiteren konnten in der 2D Kultur eine erhöhte Sensitivität gegenüber Arzneiwirkstoffen sowie Funktionsverluste (*loss of function*) beobachtet werden (Frey *et al.*, 2014).

Im Vergleich zur zuvor beschriebenen Kultivierung von Zellen in einer artifiziellen, nicht-physiologischen Matrix, wie Matrigel oder Kollagen, entspricht die *Hanging drop*-Methode aufgrund der ausgeprägten, direkten Zell-Zell-Interaktionen und der selbstständigen Aggregation eher der *in vivo* Situation (Amann *et al.*, 2014; Foty, 2011). Weitere Vorteile sind die Auswirkung der Gravität auf die Zellkultur, die Nährstoffversorgung und die Luft-Flüssigkeits-Grenze (*Air-Liquid-Interface*, ALI) (Amann *et al.*, 2014). Außerdem ist es möglich, die frei von Matrix hergestellten Sphären für weiterführende Analysen einzusetzen.

Weiterhin existieren inzwischen zahlreiche rekonstruierte *in vitro* Epidermis- und Vollhautmodelle, die hauptsächlich zur Untersuchung von Zytotoxizität, Irritation (Welss *et al.*, 2004) und Wundheilung (Das *et al.*, 2015; Maione *et al.*, 2015) eingesetzt werden. Diese besitzen bisher noch keine Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel oder Schweißdrüsen (Ackermann *et al.*, 2010; Bellas *et al.*, 2012; Diekmann *et al.*, 2016; Reijnders *et al.*, 2015).

#### **1.3.4. Spezifische Marker ekkriner Schweißdrüsenzellen**

In der Literatur sind einige Schweißdrüsen-spezifische Marker bekannt, die zur Identifikation und zur Differenzierung von ekkrinen Schweißdrüsenzellen in der Zellkultur eingesetzt werden (Tab. 2). Zu diesen Schweißdrüsen-spezifischen Markern zählen in erster Linie intrazelluläre Proteine (Strukturproteine), Oberflächenproteine, Neuropeptide, Ionenkanäle und Rezeptoren.

Zur Kontrolle der Gewebespezifität werden die Marker CEACAM5, Zytokeratin 19 (CK19) (Biedermann *et al.*, 2010) oder CFTR eingesetzt (Cui & Schlessinger, 2015). Mit diesen Markern werden jeweils das Coil und der Dukt markiert. Die Haut (Epidermis, Dermis etc.) exprimiert diese Marker in adulter Haut nicht, sodass spezifisch ekkrine Schweißdrüsenzellen in der Kultur identifiziert werden können. Somit ist eine allgemeine Unterscheidung zwischen Fremdgewebszellen, wie der Haut, und ekkrinen Schweißdrüsenzellen möglich.

Zur Identifikation eines bestimmten Subzelltyps des sezernierenden Coils (*clear cells*, *dark cells*, Myoepithelzellen) oder des resorbierenden Dukts können charakteristische Marker der einzelnen Zelltypen verwendet werden. Da die Marker meist in mehreren zellulären Bestandteilen der ekkrinen Drüse vorkommen, eignen sich nur wenige Marker zur eindeutigen Identifikation eines bestimmten Kompartiments oder eines Zelltyps. Zu den Dukt-spezifischen Markern gehören beispielsweise CD200 (*cluster of differentiation 200*), Involucrin oder Zytokeratin 10 (CK10) (Biedermann *et al.*, 2010).

**Tabelle 2: Marker zur Identifikation von zellulären Komponenten der humanen ekkrinen Schweißdrüse.** Modifiziert nach Zancanaro *et al.*, Biedermann *et al.* und Cui & Schlessinger (Biedermann *et al.*, 2010; Cui & Schlessinger, 2015; Zancanaro *et al.*, 1999).

Anatomische Struktur	Markierte Komponente bzw. spezifischer Subzelltyp	Marker zur Identifikation
Dukt und Coil	Dukt und Coil	CEACAM5, CK19, CFTR
Resorbierender Dukt	Dukt (z.T. keine genaue Lokalisation bekannt)	CFTR, CD200, CEACAM5, Involucrin, CK10, CK19
	Basale Zellen	CFTR, ENaC, Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase, NKCC1 (schwach), NHE1, CK1, CK10, CK5, CK14
	Luminale (apikale) Zellen	CFTR, NHE1, CK10, CK19, CK77
Sezernierendes Coil	Coil (z.T. keine genaue Lokalisation bekannt)	CFTR, CEACAM5, CK19, ANO1
	<i>Clear cells</i>	CFTR, NKCC1, Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase, NHE1, AQP5, CAII, CK8, CK18, Substance P, S100
	<i>Dark cells</i>	CFTR, NKCC1, Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase, NHE1, AQP5, CGRP, CK8, CK18
	Myoepithelzellen	CK5, CK14, α-SMA, NOS-I, ChAT, S100

Zur Differenzierung der Subtypen des Coils kann z.B. ANO1 oder AQP5 eingesetzt werden. Bei Verwendung des AQP5-Markers werden Myoepithelzellen allerdings nicht identifiziert. Die genaue Lokalisation von ANO1 innerhalb des sezernierenden Coils ist noch weitgehend ungeklärt und konnte bisher nur für sezernierende Zellen bestätigt werden (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014). *Clear cells* können spezifisch mithilfe der Marker

Substance P oder Carboanhydrase II (CAII) markiert werden. Für *dark cells* ist mit CGRP nur ein einziger charakteristischer Subzelltyp-Marker bekannt. Ca<sup>2+</sup>-bindende Proteine 100 (S100) dienen als *clear cell*- und als Myoepithelzellen-Marker. Myoepithelzellen können mithilfe der spezifischen Marker  $\alpha$ -SMA, der Stickstoffmonoxid-Synthase I (NOS-I) oder der Cholin-Acetyltransferase (ChAT) identifiziert werden (Zancanaro *et al.*, 1999).

Insgesamt können mithilfe der Schweißdrüsen-spezifischen Marker Kompartimente sowie Subzelltypen der ekkrinen Schweißdrüse identifiziert und differenziert werden. Jedoch ist aufgrund der geringen Anzahl bekannter Marker und deren z.T. ungeklärter Lokalisation die Verfügbarkeit der charakteristischen Schlüsselmarker begrenzt.

#### 1.4 Kosmetische Aspekte – Antitranspirantien und Deodorants

In Abschnitt 1.2.2.6 wurden verschiedene Erkrankungen der Schweißdrüsen beschrieben. Der Schwerpunkt der kosmetischen Forschung humaner Schweißdrüsen liegt in der Reduktion der Schweißmenge im Unterarmbereich (Antitranspirantien) sowie in der Minimierung des Schweißgeruches (Deodorants). Mit dem „Mum Deodorant“ kam ein solches geruchsmindernde Produkt erstmals im Jahre 1888 auf den Markt. Heutzutage sind diese Kosmetika in verschiedenen Ausführungen (Aerosole, Roller, Cremes, Sticks etc.) zu erwerben (Laden, 1999). Im Allgemeinen werden die Begriffe „Antitranspirant“ und „Deodorant“ in Europa nicht eindeutig unterschieden, sodass z.B. in Deutschland meist beide Produkteigenschaften gleichgestellt und der Begriff „Deo“ verwendet wird (Streker & Kerscher, 2012). Deodorants enthalten Substanzen, die zur Minderung des Körpergeruches eingesetzt werden. Dies wird mittels antimikrobieller Wirkstoffe (Triclosan, Alkohole, Glykole) oder Parfüm erzielt (Benohanian, 2001).

Die Schweiß-reduzierenden und Körpergeruch-hemmenden Wirkstoffe werden bei Hyperhidrotikern, die unter übermäßigem Schwitzen, Körpergeruch und demzufolge unter psychosozialen Folgen leiden, stark dosiert (> 20 %) eingesetzt. Der Einsatz verursacht allerdings starke Hautirritationen (Laden, 1999). Zu den aktiven Wirksubstanzen in Antitranspirantien zählen meist Aluminiumsalze (Aluminiumchlorohydrat) und andere metallische Salze, wie Zirkonium. Die Schweißdrüse wird nach Bildung und Präzipitation eines Konglomerats aus metallischen Ionen und Mucopolysacchariden mechanisch „verstopft“. Es wird vermutet, dass der Dukt und das Acrosyngium der ekkrinen Schweißdrüse dabei funktionell und strukturell beeinträchtigt oder sogar beschädigt werden können (Benohanian, 2001). Weiterhin wurde die Frage aufgeworfen, ob die auf die Haut aufgetragenen metallischen Salze penetrieren und intradermal akkumulieren (Guillard *et al.*, 2012).

Zusammenfassend bedarf es neuer, hautverträglicherer Wirkstoffe für die kosmetische Forschung, die zur Reduktion der Schweißmenge und/oder zur Minimierung des Körpergeruchs eingesetzt werden können. Diese könnten möglicherweise auch bei der Behandlung von krankhaftem Schwitzen, wie insbesondere bei der Hyperhidrose und der Bromhidrose, Anwendung finden.

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein rekonstruiertes 3D Modell der ekkrinen Schweißdrüse zu entwickeln. Dieses 3D Modell könnte zur Analyse des teils noch unbekanntem ekkrinen Sekretionsmechanismus und zur Identifikation von weiteren Wirkstoffen gegen eine fehlregulierte Schweißproduktion eingesetzt werden. Nach der Gewinnung von nativen Schweißdrüsen aus Humanhaut und der 2D Kultivierung sollte die *scaffold*-freie *Hanging drop*-Technologie zur Entwicklung dieses 3D Modells angewendet werden. Um morphologische und physiologische Unterschiede zwischen Coil- und Dukt-Zellen *in vitro* zu analysieren, wurden die Zellen aus den Kompartimenten, d.h. des sezernierenden Coils oder des resorbierenden Dukts, sowohl getrennt voneinander als auch gemeinsam (Co-Kultur) kultiviert und charakterisiert. Die Charakterisierung sollte mittels umfassender molekularbiologischer und proteinbiochemischer Analysen an 2D Kulturen und an rekonstruierten 3D Modellen der humanen Schweißdrüse durchgeführt werden. Zur Identifikation der Subzelltypen der ekkrinen Schweißdrüse – *clear cells*, *dark cells*, Myoepithelzellen, Dukt-Zellen und Stammzellpopulationen – sollten Schweißdrüsen-spezifische Marker eingesetzt werden. Außerdem sollten die Differenzierung und die apikal-basale Polarität, die für die Funktionalität der epithelialen Schweißdrüsenzellen eine entscheidende Rolle spielt, im 3D Modell untersucht werden. *In vivo* ist ACh hauptsächlich für die cholinerge Innervierung der ekkrinen Schweißdrüse verantwortlich. Nach der Charakterisierung des 3D Modells sollten die Kulturbedingungen daher durch ACh optimiert werden. Anhand Schweißdrüsen-spezifischer Marker sollte nach cholinergem Stimulation der 3D Modelle die Analyse auf Ebene der Gen- und Proteinexpression erfolgen. Zudem sollte die Physiologie und die Funktionalität der Schweißdrüsenzellen bestätigt werden. Dazu sollte der Nachweis des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstroms durch den Einsatz von Agonisten und Antagonisten im 3D Modell erbracht werden. Zusätzlich sollten die 3D Modelle in ein *in vitro* Vollhautmodell integriert und deren Einfluss auf die Homöostase der Haut im Modell untersucht werden. Nach einer erfolgreichen Etablierung ist der Einsatz eines organotypischen rekonstruierten 3D Modells in vielen Bereichen denkbar. Ein physiologisches 3D Modell der Schweißdrüse könnte aufgrund der vielseitigen Eigenschaften zur Identifikation neuer Wirkstoffe gegen fehlreguliertes Schwitzen oder auch zur besseren Analyse von Wundheilungsprozessen und der Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut Einsatz finden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetylcholin (ACh)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Adenin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Adenosintriphosphat (ATP)	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Amidoschwarz 10B	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Antibody Diluent	Dako (Glostrup, Dänemark)
Ascorbylphosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
$\beta$ -Mercapoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bicine	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
BisTris (Bisamino-Trismethan)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Blotting Grade Blocker, Milchpulver	Bio-Rad (Hercules, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Brilliant Sybr Green	Stratagene (San Diego, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Choleratoxin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR (Radnor, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM)	Gibco, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM), no phenol red	Gibco, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Invitrogen (Carlsbad, USA)
ECL Western Blotting System	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Epidermal growth factor (EGF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Entwicklerkonzentrat	AGFA (Mortsel, Belgien)
Eosin	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Essigsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

---

Ethanol, 99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fetal Clone II	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Fixierkonzentrat	AGFA (Mortsel, Belgien)
Fluorescence Mounting Medium	Dako (Glostrup, Dänemark)
Fluo-4 AM	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Gentamicin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glykopyrrolat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatoxylin	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Ham's F12 Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Insulin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumchlorid, KCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumsulfat, $\text{K}_2\text{SO}_4$	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kollagen Typ I Rat Tail	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Kollogenase Typ V	Merck (Darmstadt, Deutschland)
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Glutamat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
MagicMark XP, Marker	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Methanol	VWR (Radnor, USA)
3-N-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Nukleosidtriphosphate, dNTP's	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
NuPage Sample Buffer 4x	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin	Invitrogen (Carlsbad, USA)

Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Probenezid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Random Primer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Reverse Transkriptase (MMLV)	Promega (Mannheim, Deutschland)
RNase freies Wasser	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNasin	Promega (Mannheim, Deutschland)
RT-Puffer (5x)	Promega (Mannheim, Deutschland)
ROX Referenz-Farbstoff	Stratagene (San Diego, USA)
Salzsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
See Blue Plus 2, Marker	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Thermolysin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Thyronin Supplements (T3, T4)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TritonX-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
0,05% Trypsin	Gibco, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Tween-20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Water soluble tetrazolium salt (WST-1)	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ziegennormalserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser, Glasflaschen	Schott (Mainz, Deutschland)
Chamberslides, Nunc Lab Tek II	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chemiluminescence Film	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Combitips, variable Größen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Deckgläser	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Einbettfiltereinsätze, Cellsafe	Cell Path (Newton, UK)
Einweghandschuhe	Kroschke (Braunschweig, Deutschland)

Einwegwannen	Corning Incorporated (Corning, USA)
Falcons, variable Größen	Corning Incorporated (Corning, USA)
Frischhaltefolie, Saran	Saropack (Rorschach, Schweiz)
Gelkassetten Novex Mini Cell	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Kanülen, Mikropipetten 20 µl	Brand (Wertheim, Deutschland)
Kryovials	Nunc, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Mikrotiterplatten, black clear bottom	Corning Incorporated (Corning, USA)
Mikrotiterplatten, 96 well	Corning Incorporated (Corning, USA)
Nitrocellulose Membran	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Objektträger (Super Frost Plus)	Menzel (Braunschweig, Deutschland)
Parafilm	Bemis (Neenah, USA)
PCR-Platten, 96 well	Stratagene (San Diego, USA)
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen, variable Größen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen, Griptip	Costar, Corning Incorporated (Corning, USA)
Reaktionsgefäße, variable Größen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Serologische Pipetten, variable Größen	Corning Incorporated (Corning, USA)
Skalpelle	Braun (Melsungen, Deutschland)
Sponge Pad Blotting	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Whatman-Papier	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Zählkammern, C-Chip	NanoEnTek (Seoul, Südkorea)
Zellkultureinsätze, Inserts (24 well)	Corning Incorporated (Corning, USA)
Zellkulturflaschen, variable Größen	Corning Incorporated (Corning, USA)

### 2.1.3 Kits

Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
GravityPlus Hanging drop System Kit	Insphero (Schlieren, Schweiz)
Live-Dead Assay Cytotoxicity Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
RNeasy micro Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### 2.1.4 Geräte

Absaugvorrichtung Vacu Boy	IBS Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Analysewaagen	
Analysewaage AG204	Mettler Toledo (Columbus, USA)
Waage, PG802-S	Mettler Toledo (Columbus, USA)
Waage, Sartorius Excellence	Sartorius (Ratingen, Deutschland)
Brutschrank	Binder (Neckarsulm, Deutschland)
CellZscope	NanoAnalytics (Münster, Deutschland)
Einfrierbox, Mr. Frosty	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Entwässerungsautomat, Tissue Tek	Sakura (Tokio, Japan)
Entwicklermaschine, Curix 60	AGFA (Mortsel, Belgien)
BD Accuri C6	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Gefrierschränke (-20°C, -80°C)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Elektrophoresekammer Novex Mini Cell	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Heizblock, HBT130	HLC, Direct Industry (Marseille, Frankreich)
Histo Tek Slide Stainer	Miles Scientific (Princeton, USA)
Kryostat CM1900	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Kühlplatte, Arcadia C	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Magnetrührer, RCT basic	IKA Werke (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Mikroskope	
Binokular SZ61	Olympus (Tokio, Japan)
Mikroskop BX51	Olympus (Tokio, Japan)
Mikroskop CKX41	Olympus (Tokio, Japan)
Mikroskop SZX200	Olympus (Tokio, Japan)
Mikrotom, RM2145	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikroliterpipetten, elektronisch	Brand (Wertheim, Deutschland)
NanoDrop 1000	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Paraffin-Erwärmer, EG1140H	Leica (Wetzlar, Deutschland)
PCR-Cycler, PTC-200	MJ Research, GMI (Minneapolis, USA)

pH-Meter, CG840	Schott (Mainz, Deutschland)
Platereader Genios Pro	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Platereader Spectramax 190	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Pipettierhilfe, Pipetboy	IBS Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Schüttler, KL-2	Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland)
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph (Elk Grove Village, USA)
Spannungsquelle Elektrophorese	Gel Company (San Francisco, USA)
Stickstofftank	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Stratagene qRT-PCR Cycler	Stratagene (San Diego, USA)
Tissue Embedding Center EG1140H	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Trockenschrank	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Vortexer, VF2	IKA Werke (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Wasserbad, Mendigen W6	PD Group (Wilsdruff, Deutschland)
Werkbank, HeraSafe	Thermo Elektron Corp. (Cambridge, UK)
Zeitrafferaufnahmen, CytoSmart	Lonza (Basel, Schweiz)
Zentrifugen	
Heraeus Fresco 17	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Plattenzentrifuge 4-15C	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Tischzentrifuge pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus (Hanau, Deutschland)
<b>2.1.5 Software</b>	
BD Accuri C6 Plus	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
CellZscope Software	NanoAnalytics (Münster, Deutschland)
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software (La Jolla, USA)
ImageJ und Fiji	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Power Point 2016	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Mx3000P Software	Agilent Genomics (Santa Clara, USA)

Nanodrop 1000	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
CellSens Dimension Olympus	Olympus (Tokio, Japan)
TotalLab100	TotalLab Limited (Newcastle, UK)
XFluor4 Software	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung Immunfluoreszenz (PBS)	10 % Normales Ziegen Serum 0,1 % TritonX-100
Blockierungslösung Western Blot (5 % Milchpulver)	10 g auf 200 ml TBST-Puffer
De-Esterifizierungslösung	DMEM mit Glutamax (Phenol-frei) 2,5 mM Probenesid
Laufpuffer (20x Stock)	60,6 g Tris 3 g EDTA 104 g MOPS 10 g SDS 1000 g destilliertes H <sub>2</sub> O auffüllen
PBS	2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 138 mM NaCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure
Popov Lösungen I-III	I) Methanol-Essigsäure Gemisch (9:1) II) 325 mg Amidoschwarz 10B + 25 ml Lsg. I III) Lsg. I + Lsg. II (9:1)
Reaktionsansatz cDNA-Synthese	4 µl 5x RT Puffer 1 µl dNTP Mix 1 µl MMLV Reverse Transkriptase 0,5 µl RNasin 2,5 µl RNase-freies Wasser 1 µl Random Primer
Reaktionsansatz qRT-PCR	12,5 µl Brilliant Sybr Green 2,5 µl (2 µM) Primer (s/as) 0,3 µl ROX Referenz-Farbstoff 4,7 µl RNase-freies Wasser
SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer)	40 % Glycerin 20 % β-Mercaptoethanol 12 % SDS 0,4 % Bromphenolblau

SDS-Lysepuffer	50 mM TrisHCl 1 % SDS Protease-Inhibitor Cocktail (1:1000)
Stoppmedium	10 % FCS in DMEM
TBS (20x Stock)	24,23 g Tris 174 g NaCl auf 1000 ml mit destilliertem H <sub>2</sub> O auffüllen
TBST	950 g destillierte H <sub>2</sub> O 50 ml 20x TBS 500 µl Tween-20
Transfer-Puffer	52,3 g BisTris 3 g EDTA 40,8 g Bicine 10 % Methanol auf 500 g mit destilliertem Wasser auffüllen
WST-1-Lösung	WST-1 Reagenz (ready to use) in Phenol-freiem Medium (1:6)

### 2.1.7 Zellkulturmedien

Einfriermedium	Kultivierungsmedium Schweißdrüsenzellen 10 % DMSO
Fluo-4 AM Inkubationsmedium	DMEM mit Glutamax (Phenol-frei) 4 µM Fluo-4 AM 2,5 mM Probenezid
Schweißdrüsenzellen-Kultivierungsmedium	DMEM mit Glutamax/ Ham's F12 (3:1) 10 % Fetal Clone 10 <sup>-10</sup> M Cholera toxin 0,12 UI/ml Insulin 24 µg/ml Adenin 1 mM Ascorbylphosphat 2x10 <sup>-9</sup> M Triiodothyronin 10 ng/ml EGF 100 U/ml Penicillin 25 µg/ml Gentamicin
Live-Dead Assay Inkubationsmedium	2 µM Calcein AM 4 µM Ethidium Homodimer-1
Verdaumedium Hautbiopsie (DMEM)	0,5 % Kollagenase Typ V 0,25 mg/ml Thermolysin

### 2.1.8 Primer

**Tabelle 3: qRT-PCR Primer.** Die Primer wurden nach dem Design bei Sigma-Aldrich hergestellt (Ausnahmen: ANO1, CFTR von Qiagen). ANO1- und CFTR-Sequenzen sind damit nicht bekannt. s – sense/kodierender Strang, as – antisense/nicht-kodierender Strang.

Gensymbol	Genname	Sequenz (5'-3')
CEACAM5	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5</i>	s: TCATCCTGAATGTCCTCTATG as: GTGATGTTGGAGATAAAGAGC
CHRM3	Muskariner Acetylcholin Rezeptor 3	s: ACAATAAGGTTTTGGGTC as: AACCAATACAATGTGTCCAG
AQP5	Aquaporin 5	s: CCACCTTGTCGGAATCTACTT as: CTGAACCGATTCATGACCAC
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1	s: AGGATGGCAAGACTGCAACT as: CGTGCAACTGGGAGACTCAT
ANO1	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter Chloridkanal Anoctamin-1	Hs_ANO1_1_SG (QT00076013, Qiagen)
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	Hs_CFTR_1_SG (QT00070007, Qiagen)
GalR2	Galanin Rezeptor 2	s: GACAGGTATCTGGCCATC as: CGGTAGTAGCTCAGGTAG
GalR3	Galanin Rezeptor 3	s: CTGATGCCCAGAACATTTCA as: GTGCCCAGCAGGAAGATTAG
PIP	<i>Prolactin-induced protein</i> , Prolaktin-induziertes Protein	s: TCAGGACAACACTCGGAAGA as: GAGGGATGCTGCTAATGAGG
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	s: ATCGACCACTACCTGGGCAA as: TTCTGCATCACGTCCCGGA
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	s: ACAGTTGCCATGTAGACC as: TTTTGGTTGAGCACAGG

### 2.1.9 Antikörper

**Tabelle 4: Eingesetzte Primärantikörper.** Die zur Charakterisierung verwendeten Antikörper wurden hier mit ihrer Verdünnung, dem Wirt (Klonalität) und den Herstellerangaben aufgeführt. Rb – Kaninchen, Ms – Maus, Rat – Ratte.

Antikörper	Verdünnung	Wirt (Klonalität)	Hersteller	Bestellnummer
CEACAM5	1:250	Rb (polyklonal)	Abcam	Ab15987
CK19	1:100	Ms (monoklonal)	Progen	61010
AQP5	1:200	Rb (monoklonal)	Abcam	Ab92320

NKCC1	1:200	Rb (polyklonal)	Abcam	Ab59791
CHRM3	1:150	Rb (polyklonal)	Sigma-Aldrich	HPA024106
GalR2	1:200	Rb (polyklonal)	Sigma-Aldrich	HPA044513
TRPM8	1:300	Rb (polyklonal)	Abcam	Ab104569
Ki67	1:300	Ms (monoklonal)	Abcam	Ab8191
CK10	1:200	Ms (monoklonal)	Dako	M7002
CK15	1:150	Ms (monoklonal)	Millipore	CBL272
S100 A8/A9	1:150	Ms (monoklonal)	HyCult Biotechnology	Clone 27E10
CD200	1:200	Ms (monoklonal)	Abd Serotec	MCA1960T
CGRP	1:100	Ms (monoklonal)	Abcam	Ab81887
Involucrin	1:500	Ms (polyklonal)	Abcam	Ab53112
$\alpha$ -SMA	1:200	Ms (monoklonal)	Dako	M0851
Substance P	1:150	Rat (monoklonal)	Gene Tex Inc.	GTX72999
ANO1	1:300 -1:500	Ms (monoklonal)	Abcam	Ab190721
CFTR	1:100-1:200	Ms (monoklonal)	Abcam	Ab2784
Nestin	1:100-1:200	Rb (polyklonal)	Abcam	Ab82375

**Tabelle 5: Sekundärantikörper.** Verwendete konjugierende Sekundär-Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung bzw. Western Blot-Analyse. Goat – Ziege, IgG – Immunglobulin G.

Antikörper	Verdünnung	Wirt	Spezifität	Hersteller	Bestellnummer
Alexa Fluor 488 Anti-Ms IgG	1:200	Rb	Anti-Ms	Invitrogen	A11059
Alexa Fluor 488 Anti-Rb IgG	1:200	Goat	Anti-Rb	Invitrogen	A11034
Alexa Fluor 488 Anti-Rat IgG	1:200	Goat	Anti-Rat	Invitrogen	A11006
Alexa Fluor 568 Anti-Ms IgG	1:200	Goat	Anti-Ms	Invitrogen	A11004
Alexa Fluor 568 Anti-Rb IgG	1:200	Goat	Anti-Rb	Invitrogen	A11011
Goat Anti-Ms IgG	1:2500	Goat	Anti-Ms	Millipore	AP124
Goat Anti-Rb IgG	1:2500	Goat	Anti-Rb	Millipore	AP132

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Verdau von Humanhaut und Isolation von Schweißdrüsen

Zur Isolation von Schweißdrüsen wurden humane Gewebeproben von plastischen Operationen mit der schriftlichen Zustimmung der gesunden Patienten anonymisiert verwendet. Die Humanbiopsien stammten aus Gesichtshaut- oder Oberarmstraffungen. Bei der Verwendung von Oberarmbiopsien konnten sowohl ekkrine als auch apokrine Schweißdrüsen gewonnen werden.

Die Humanhaut wurde mithilfe eines Skalpell in etwa 1 x 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und anschließend enzymatisch verdaut. Dazu wurden die Gewebestücke in das „Verdaumedium“ mit 0,5 % Kollagenase Typ V und 0,25 mg/ml Thermolysin in Falcons überführt, sodass die Hautstücke vollständig bedeckt waren. Der Verdau erfolgte für 3-5 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Nach mehrmaligem Schütteln der Probe wurde die enzymatische Reaktion nach Ablauf der Verdauzeit durch die Zugabe von 20-30 ml DMEM-Medium abgestoppt. Zur Entfernung von überschüssigem Fettgewebe wurde die Lösung bei 1200 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) für 5 Minuten (min) zentrifugiert. Nach der Entnahme des sich als Überstand abgesetzten Fettgewebes wurde die Verdauung mithilfe eines Binokulars auf Schweißdrüsen untersucht. Die Isolation erfolgte mit 20 µl Kapillaren, sodass die intakten Schweißdrüsen in geeignete Kultivierungsgefäße (Zellkulturflaschen/-kammern) überführt werden konnten.

Bei Kultivierung der einzelnen Kompartimente (Dukt oder Coil) wurden diese mithilfe eines Skalpell an der Transitionszone vorsichtig voneinander getrennt und separat kultiviert.

Die isolierten Drüsen wurden mit dem „Schweißdrüsenzellen-Kultivierungsmedium“ kultiviert (siehe 2.1.7). Nach erfolgreicher Anheftung der humanen primären Schweißdrüsen kam es zur Migration der Schweißdrüsenzellen aus dem Ursprungsgewebe (*in situ*), sodass die Verfolgung des Auswuchses und der direkte Vergleich von *in situ* nach *in vitro* möglich war. Zur Adhäsion und zur Kultivierung der Primärkultur war außerdem die Beschichtung der Zellkulturgefäße (*Coating*) mit 5 µg/cm<sup>2</sup> Kollagen Typ I notwendig. Kollagen Typ I zählt zu den häufigsten fibrillären Kollagenen, welche in der Dermis und anderen Bindegeweben vorkommen.

Nach Adhäsion des Gewebes migrierten die Schweißdrüsenzellen aus dem *in situ* Gewebe, d.h. aus dem Coil- und/oder dem Dukt-Kompartiment. Das Medium wurde erst nach Anheften der Drüsen standardmäßig alle 2-3 Tage (D) gewechselt, um das Absaugen der sich im Medium befindenden losen Drüsen zu verhindern. Nach wenigen Tagen proliferierten die Primärzellen auf dem Zellkulturboden, sodass diese subkultiviert wurden.

## **2.2.2 2D Zellkultur**

### **2.2.2.1 Subkultivierung der Primärzellen**

Die Schweißdrüsenzellen wurden in „Schweißdrüsenzellen-Kultivierungsmedium“ bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Passage 6 (P6) kultiviert. Nach der Anheftung der *in situ* Drüse und der Proliferation der Schweißdrüsenzellen wurden die adhärennten Zellen nach dem Erreichen der Konfluenz vom Zellkulturboden gelöst. Von (100 %) Konfluenz spricht man, wenn es zum vollständigen Bewuchs des Zellrasens kommt. Für die folgenden Versuche wurden die primären Zellen bei einer Konfluenz von 70-90 % verwendet.

Zur Subkultivierung der Zellen (Passagieren) wurde die Kultur mit PBS gespült und mit 0,05 % Trypsin für ca. 5 min im Brutschrank behandelt. Nach dem Ablösen der Zellen vom Zellkulturboden wurde die Enzymlösung mit serumhaltigen Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon überführt. Das Gefäß wurde anschließend bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zellzahlbestimmung und die Einsaat der passagierten Zellen in ein mit Kollagen Typ I-beschichtetes (*gecoatetes*)-Zellkulturgefäß. Bei jeder Trypsinierung der Zellkultur erhöht sich die Passage der Zellen um den Faktor +1. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

### **2.2.2.2 Zellzahlbestimmung**

Zur Einsaat einer genauen Zellmenge wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach dem Trypsinieren wurde das Zellpellet zur Zählung der geernteten Zellen in einer definierten Menge Medium resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl der Suspension mit 50 µl Trypanblau versetzt und in die Zählkammer gegeben. Der Farbstoff dringt dabei in tote Zellen mit defekter Membran ein, sodass an dieser Stelle auch eine Lebend-Tot-Unterscheidung stattfindet. Dabei wurden nur die intakten Zellen gezählt. Nach Auszählung der Großquadrate und Bildung des

Mittelwerts wurde die Zellzahl pro ml Medium bzw. die Gesamtzellzahl unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

### **2.2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Zur Konservierung der Zellen wurden die Humanzellen in „Einfriermedium“, welches 10 % DMSO enthält, eingefroren. Nach dem Trypsinieren und der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit 1 ml „Einfriermedium“ versetzt und in Kryoröhrchen überführt. In einer geeigneten mit Isopropanol befüllten Einfrierbox erfolgte ein langsamer Einfrierprozess mit der Abkühlung der Proben. Die Proben temperatur nimmt mit ca. - 1 °C pro Minute im -80 °C Kühlschrank kontinuierlich ab. Im Anschluss wurden die Proben in Stickstofftanks überführt, die eine langfristige Lagerung bei -175 °C gewährleisten.

Bei Bedarf wurden die Zellen wieder aufgetaut und für weiterführende Analysen verwendet. Dazu wurden die Proben aus dem Stickstofftank entnommen und mit 5 ml, auf 37 °C erwärmten serumhaltigen Medium versetzt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 5 min, um das Medium mit DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgesaugt, die pelletierten Zellen in „Schweißdrüsenzellen-Kultivierungsmedium“ resuspendiert und in der gewünschten Menge Medium in Zellkulturgefäße eingesät. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel zur Entfernung toter Zellen.

### **2.2.2.4 Zeitrafferaufnahmen isolierter Schweißdrüsen zur Analyse des Migrationsverhaltens**

Um das Anheftungsverhalten von isolierten Schweißdrüsen sowie die Migration und Proliferation von Schweißdrüsenzellen zu analysieren, wurde das Ursprungsgewebe mithilfe eines *Live Cell Imaging*-Systems beobachtet. Dazu wurden die Zellkulturgefäße mittels des miniaturisierten Inkubator-Mikroskops namens „CytoSMART“ überwacht. Das Wachstum der Zellen wurde im Abstand von je 15 min automatisiert und kontinuierlich mit Zeitrafferaufnahmen verfolgt. Durch diesen automatisierten Prozess sind die Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit zeitlich sehr konstant, da zur Mikroskopie der Brutschrank nicht geöffnet werden musste. Neben den Aufnahmen der Kultur wurde zudem die Konfluenz anhand der graphischen Daten ermittelt.

### 2.2.2.5 Transepitheliale elektrische Widerstands (TEER)-Messung

Epithelzellen bilden *in vivo* als charakteristisches Merkmal eine luminale und eine basolaterale Seite aus. Die Zellen stellen auf diese Weise eine selektiv permeable Schicht dar, die unterschiedliche Kompartimente mit einer gewissen chemischen Komposition voneinander trennen. Die Transportwege sind entweder parazellulär (durch die Zellzwischenräume, sog. *Tight Junctions*) oder transzellulär (durch die Zelle) (Benson *et al.*, 2013).

Mithilfe der Impedanzspektroskopie-Messung mithilfe des „cellZscope“-Geräts wurde der gewebespezifische transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) der Zellen gemessen. Zur Messung des TEER wurde 260 µl Zellsuspension in transluzente 24 well-Zellkultureinsätze (Inserts) mit ca.  $1 \times 10^5$  Zellen pro Insert gesät. Das Insert mit Zellsuspension stellt somit das apikale (innere) Kompartiment dar. 810 µl Standardmedium der Schweißdrüsenzellen wurde in das basolaterale (äußere) Kompartiment gegeben. Beide Kompartimente werden durch die permeable Membran des Inserts mit einer Porengröße von 0,4 µm voneinander getrennt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, indem 70 % des Mediums mit frischem Medium ersetzt wurde. Zur Behandlung der Zellen wurde die Behandlungslösung in das entsprechende Kompartiment pipettiert.

Nachdem das System mit der Abdeckung versehen wurde und in den Brutschrank gestellt wurde, erfolgte die Analyse der Barrierefunktion mit Anlegen der Wechselspannung in Echtzeit. Dabei wurden die elektrische Kapazität der Membran (Ccl) und die gebildete Barriere als TEER gemessen. Der Ccl-Wert weist nach Herstellerangaben auf die Konfluenz der Zellen hin, sodass dieser aufgrund des gleichförmigen Aufbaus der Lipiddoppelschicht unabhängig vom Zelltyp bei 1 µF(Mikrofarad)/cm<sup>2</sup> liegt. Da die Barriere erst nach Bildung eines Zellrasens gemessen werden kann, ist dieser Kontrollwert besonders wichtig. Die Messdaten wurden mithilfe der cellZscope-Software evaluiert und als Diagramm dargestellt.

### 2.2.2.6 Zytotoxizitätsanalyse mithilfe des WST-1-Tests

Während der Behandlung einer Zellkultur mit einer Wirksubstanz kann es zu zytotoxischen Effekten kommen, die sich negativ auf die Vitalität der Zellen auswirken. Zur Untersuchung dieser Auswirkungen und zur Bestimmung der *in vitro* Einsatzkonzentration der Substanz in der Zellkultur wurde ein WST-1 (*water soluble*

*tetrazolinium*)-Assay durchgeführt. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz mit der chemischen Nomenklatur 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) wird in Lösung durch die enzymatische Spaltung des Farbstoffs zu Formazan hydrolysiert. Dies löst einen Farbumschlag von schwach rot bis dunkelrot aus, welcher photometrisch bei 450 nm gemessen werden kann. Die Umsetzung des Farbstoffs geht auf das intakte mitochondriale Succinat-Dehydrogenase-System der Atmungskette vitaler Zellen zurück. Dabei ist die Aktivität der Zellen linear zur Absorption des Farbstoffs.

Dazu wurden die Schweißdrüsenzellen in einer 96 well-Mikrotiterplatte bis zur 70-80 %igen Konfluenz kultiviert und mit den zu analysierenden Substanzen inkubiert. Dabei wurden jeweils 5-10 Konzentrationen einer Substanz in absteigender Konzentration sowie unbehandelte Zellen im WST-1-Test analysiert. Jede Wirksubstanz, die hier zur Behandlung der Zellkultur eingesetzt wurde, wurde in einem WST-1-Test auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Die Einwirkzeit variierte dabei je nach Einsatz der Substanz im entsprechenden Experiment. Nach Inkubation der Substanzen wurden die Zellen mit phenolrotfreiem Medium gewaschen und auf ihre Schädigung durch die Zugabe von WST-1-Lösung überprüft. Die Lösung wurde 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die optische Dichte (OD) bei 450 nm gemessen. Die Vitalität wurde nach der Formel

$$\text{Vitalität (\%)} = [\text{OD}_{450} (\text{behandelte Zellen}) / \text{OD}_{450} (\text{unbehandelte Zellen})] \cdot 100$$

prozentual bestimmt und graphisch dargestellt.

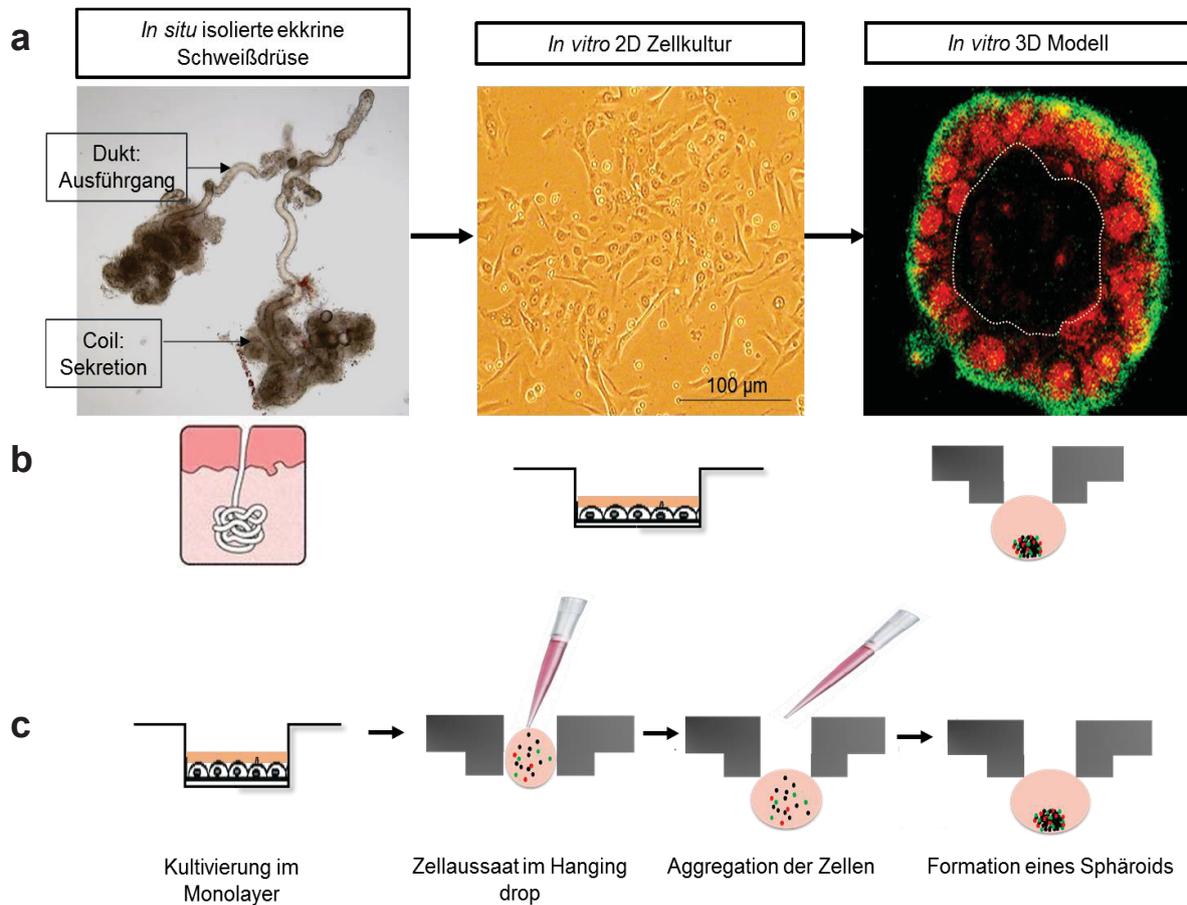
## 2.2.3 3D Modelle

### 2.2.3.1 Herstellung von 3D Modellen

Neben den 2D Monolayerkulturen (siehe 2.2.2) wurden auch 3D Modelle mit humanen Primärzellen der Schweißdrüse hergestellt. Dazu wurde die *Hanging drop* („hängende Tropfen“)-Technologie verwendet, die eine Kultivierungsmethode darstellt, welche die Physiologie und somit die *in vivo* Situation von epithelialen Zellen verstärkt widerspiegelt (siehe 1.3.2).

Zur Herstellung der Sphäroide (Aggregate) wurde das sog. „GravityPlus Hanging Drop System“ des Herstellers Insphero verwendet. Dieses patentierte System besteht aus

einer 96 well-Mikrotiterplatte mit einem Einfüllsystem („Sure Drop Inlet“) und einer 96 well-Ernteplatte.



**Abbildung 5: Herstellung von 3D Modellen mittels *Hanging drop*-Technologie.** a) Isolierte Drüse mit Dukt- und/oder Coil-Kompartiment wurden in Zellkulturgefäße überführt. Nach Auswuchs und Proliferation der Zellen im Monolayer wurden diese anschließend in ein 3D Modell eingesetzt. b+c) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Kulturzustände: native Drüse, 2D und 3D Kultur der Schweißdrüse in b; *Hanging drop*-Herstellungsverfahren in c.

Zum Schutz vor Verdunstung ist die Mikrotiterplatte von einer Kammer umgeben, die mit ca. 2 ml Wasser befüllt wurde. Zudem wurde ein steriles Filterpapier, das vom Hersteller mitgeliefert wird, auf den Plattenboden gelegt, was mit 15 ml einer 70 % PBS/ 30 % Wasser-Mischung getränkt wurde. Nach Herstellung der Einzelzellsuspension (siehe 2.2.2.1) und nach einer Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.2.2) wurden 50  $\mu$ l der Suspension mithilfe einer Mehrkanalpipette in die Mikrotiterplatte überführt. Die 3D Modelle der Schweißdrüse wurden mit 10.000 Zellen/Kultur bis 100.000 Zellen/Kultur hergestellt und bis zu 21 Tage (D21) kultiviert.

Zur Kultivierung der 3D Modelle wurde das „Schweißdrüsenzellen-Kultivierungsmedium“ verwendet. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt, indem 40 % des eingesetzten Mediums mit frischem Medium ersetzt wurden. Bei der Behandlung der 3D Modelle wurde die entsprechende Menge der Behandlungslösung ebenfalls zum Medium hinzugefügt, wie z.B. ACh.

Die 3D Modelle wurden in 3 unterschiedlichen Ausführungen hergestellt: (1) mit Zellen des Coils und des Dukts, (2) nur mit Coil-Zellen oder (3) nur mit Dukt-Zellen. Die 3D Modelle mit gemischten Coil-Dukt-Zellen werden weiterhin als „3D Co-Kultur Modell“ bezeichnet, die beiden weiteren als „3D Coil-Modell“ bzw. als „3D Dukt-Modell“.

### **2.2.3.2 Ernte und Vermessung von 3D Modellen**

Zur Ernte der 3D Modelle wurden zunächst 80 µl Medium in die 96 well-Ernteplatte („Gravity Trap“) vorgelegt. Nach Aufsetzen der Mikrotiterplatte wurden die 3D Modelle anschließend durch das Pipettieren von 100 µl Medium geerntet und in die Ernteplatte überführt. Anschließend wurde der Durchmesser der 3D Modelle mithilfe der „CellSens Dimension“ Software des Herstellers Olympus vermessen. Für weitere Analysen wurden die 3D Modelle aus der Ernteplatte entnommen.

### **2.2.3.3 Viabilität von 3D Modellen mittels Live-Dead Assay**

Die Viabilität der 3D Modelle wurde mittels eines Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays, namens „Live-Dead Assay“, fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Die Viabilität bezeichnet die Lebensfähigkeit einer Zelle und wird auf das Vorhandensein einer intakten Zellmembran zurückgeführt. Wohingegen der Nachweis der Vitalität auch eine Aussage über die Stoffwechselaktivität der Zelle treffen kann. Bestimmte Zellkulturbedingungen können die Viabilität und die Vitalität der Zellen negativ beeinflussen und somit direkt oder indirekt Zytotoxizität, Apoptose und/oder Nekrose hervorrufen. Dieser Assay beruht auf einer Zwei-Farben-Fluoreszenz-Messung, welcher die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen im 3D Konstrukt als Doppelfärbung erlaubt. Beide Farbstoffe werden simultan zur Kultur gegeben, sodass eine Färbung der gesamten Sphäre als *whole mount*-Färbung durchgeführt wurde. Der Farbstoff Calcein Acetoxymethylester (AM) ist zellpermeabel und wird im Zytoplasma der Zellen durch intrazelluläre ubiquitäre Esterasen gespalten, sodass lebende Zellen bei Anregung mit entsprechenden Filtern grün fluoreszieren (Anregung bei 488 nm, Emission bei 514 nm). Er weist sowohl lebende als auch vitale Zellen nach. Tote Zellen

werden mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) markiert (Anregung bei 514 nm, Emission bei 633 nm). Dieser dringt nur in Zellen ein, die eine defekte löchrige Plasmamembran aufweisen.

Die 3D Modelle wurden nach ihrer Ernte 2x mit PBS gewaschen und mit der Lösung, die 2  $\mu$ M Calcein AM und 4  $\mu$ M EthD-1 enthält, für 45-60 min bei 37 °C im Dunkeln im Brutschrank inkubiert. Erneut folgten 2 Waschschrte mit PBS und die Fluoreszenzmikroskopie der 3D Modelle, die auf Glasobjektträger überführt wurden. Diese wurden mit ca. 20  $\mu$ l PBS befeuchtet. Zur Mikroskopie wurde kein Objektglas verwendet. Es wurden 3D-Stapelaufnahmen (*stacks*) aufgenommen, die Fluoreszenzkanäle überlagert sowie die Fluoreszenzintensitäten mittels ImageJ/Fiji Software quantifiziert. Die Intensitäten wurden als *corrected total cell fluorescence* (CTCF) mit der Formel

$$\text{CTCF} = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background readings})$$

kalkuliert und in einem Diagramm dargestellt.

## 2.2.4 Histologische Analysen

### 2.2.4.1 Fixierung der Zellen

Zur Analyse der Morphologie der 3D Modelle sowie der nativen Schweißdrüse im Gewebe wurden sowohl Gefrierschnitte als auch Paraffinschnitte hergestellt. Die Proben wurden zum Erhalt der Architektur der Strukturen fixiert. Für die Herstellung von Gefrierkryoschnitten wurde die Probe in eine Kryomold-Einbettform gelegt, im Kryostat leicht angefroren und in *Tissue Freezing Medium* eingebettet. Anschließend wurde sie bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Zur Fixierung von Proben für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Proben in 4 % Formalin für 24 h bei 4 °C fixiert. Danach wurden diese im Entwässerungsautomaten durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 2x 70 %, 90 %, 2x 95 % für je 1 h, 2x Isopropanol für je 1,5 h; alle Schritte bei 35 °C) dehydriert, mit Xylol durchtränkt (2x bei 35 °C für je 1,5 h) sowie in 60 °C warmes Paraffin (3x bei 60 °C für je 1,5 h) eingebettet.

### **2.2.4.2 Herstellung von Schnittpräparaten**

#### **2.2.4.2.1 Gefrierschnitte**

Zur Herstellung von Gefrierkryoschnitten aus eingebetteten Geweben oder 3D Modellen wurde das Kryostat CM1900 verwendet. Dabei wurden die Proben, die nach der Fixierung bei -80 °C eingefroren wurden, zunächst auf eine Temperatur von -27 °C äquilibriert. Anschließend wurden diese aus dem Kryomold-Form entfernt und auf einem Probenhalter mit *Tissue Freezing Medium* fixiert, welches angefroren wurde. Es wurden 5-8 µm Schnitte erzeugt, welche auf Super Frost Plus-Objektträger überführt und bei RT getrocknet wurden. Die Schnitte wurden für histologische Analysen verwendet oder gelagert.

#### **2.2.4.2.2 Paraffinschnitte**

Die in Paraffin-eingebetteten Objekte wurden zunächst auf einer Kühlplatte auf ca. 1 °C gekühlt. Im Anschluss erfolgte die Herstellung der 5 µm Paraffinschnitte mithilfe des Mikrotoms, welche mit einem Pinsel in ein 45 °C warmes Wasserbad übertragen wurden. Die glatt gezogenen Schnitte wurden auf Super Frost Plus-Objektträger überführt und üN bei 37 °C in einem Trockenschrank aufbewahrt. Die Paraffinschnitte wurden für histologische Analysen verwendet oder gelagert.

#### **2.2.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

In der Histologie sind verschiedene Färbemethoden bekannt, die zur Unterscheidung von morphologischen Gewebestrukturen eines feingeweblichen Schnittes im mikroskopischen Bild eingesetzt werden. Dazu gehört die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), die eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden für histologische Schnitte darstellt. Es werden zwei Farbstoffe, Hämatoxylin und Eosin, eingesetzt, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften unterschiedliche Strukturen anfärben. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt Strukturen in seiner basischen Form (Hämalaun) intensiv an. Zu diesen Strukturen gehören z.B. Nucleinsäuren wie DNA, Zellkerne, Ribosomen und das raue endoplasmatische Retikulum (rER). Diese sind sauer bzw. basophil und werden blau eingefärbt. Im Gegensatz dazu ist Eosin ein synthetischer saurer Farbstoff, welcher alle basischen bzw. acidophilen Strukturen rot färbt. Dazu gehören v.a. Zellplasmaproteine, Kollagenfasern und das glatte endoplasmatische Retikulum (sER) (Mulisch & Welsch, 2010).

Die hergestellten Gewebeschnitte wurden im Färbeautomat *HistoTek Slide Stainer* folgendermaßen gefärbt. Die Schnitte durchliefen diese Inkubationsschritte: Xylol (2 min), absoluter Ethanol (20 sek), 50 % Ethanol (20 sek), Hämatoxylin (3,5 min), 70 % Ethanol (20 sek), Ammoniumhydroxid-Ethanol (1,5 %/ 80 %) (20 sek), 95 % Ethanol (20 sek), Eosin (20 sek), 2x absoluter Ethanol (20 sek), abschließend Xylol (20 sek). Im Anschluss wurden die gefärbten Schnitte mit Eindeckmedium beschichtet und mit einem Objektglas eingedeckelt.

#### **2.2.4.4 Azan-Färbung**

Die Azan-Färbung ist eine weitere histologische Färbung zur Differenzierung von Bindegewebsfasern, Geweben und Zellbestandteilen. Diese Methode wurde von Heidenhain entwickelt, sodass das Färbeverfahren auch als „Azanfärbung nach Heidenhain“ bezeichnet wird. Neben Azokarmin G wird eine weitere Farbkomponente, namens Anilinblau-Goldorange, verwendet. Die einzelnen Farbstoffe binden vorzugsweise an bestimmte Gewebestrukturen. Es handelt sich somit um eine Trichrom-Färbung, die Strukturen mit Abstufungen rot bis blau färbt. Azokarmin dient vorwiegend zur Kernfärbung, wohingegen Anilinblau-Goldorange G zur Gegenfärbung der Gewebearten eingesetzt wird. Kollagenfasern (Typ I) der Matrix oder Mucus werden dabei intensiv blau gefärbt und Zellkerne rot (Fukada *et al.*, 2014; Mulisch & Welsch, 2010; van Griensven *et al.*, 2002). Andere Bestandteile der ECM oder Zytoplasma werden rötlich gefärbt (Diekmann *et al.*, 2016; Jastrow, 2014).

Zunächst wurden die Paraffinpräparate mit Xylol (2x 5 min) entparaffiniert und einer absteigenden Alkoholreihe (je 1 min in 100 %, 90 %, 70 %, 50 % Ethanol) im Färbeautomat *HistoTek Slide Stainer* rehydriert. Die Schnitte wurden anschließend in Anilinalkohol vorgebeizt (5 min), mit destilliertem Wasser gespült und mit Azokarmin G (15 min bei 56 °C) inkubiert. Nach dem erneuten Spülen mit Wasser wurden die Objekte zur Färbung der Nuclei mit Anilinalkohol für 30 min behandelt und für 1 min in essigsäuren Alkohol getaucht. Die Präparate wurden dann für 30 min in 5 %iger Phosphorwolframsäure inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung mit Anilinblau-Goldorange in Essigsäure (1:3) für 30 min. Nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in 96 % Ethanol (1 min), Isopropanol (30 sek) und Xylol (30 sek) dehydriert. Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit Eindeckmedium beschichtet und mit einem Objektglas eingedeckelt.

## 2.2.5 Molekularbiologische Analysen

### 2.2.5.1 Isolation von RNA und Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Extraktion der RNA aus nativem Gewebe (Haut, Schweißdrüse), 2D Kulturen und 3D Modellen erfolgte mithilfe des *RNeasy micro Kits* nach den Herstellerangaben. Dabei wurden das Gewebe oder die Zellkultur in 150 µl RLT-Puffer lysiert und bei Bedarf mit einer Pistille homogenisiert. Dann wurden die Proben für 30-45 min auf einem Schüttler inkubiert und entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt aufgearbeitet. Anschließend wurde 20 mg/ml Proteinase K gelöst in Wasser zugegeben und für 20 min bei 55 °C inkubiert, um Proteine, vorwiegend RNasen, zu deaktivieren. Danach wurde 500 µl 99 %iger Ethanol zugegeben und das Gemisch auf eine RNeasy MinElute Säule überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 1 min, der Überstand wurde verworfen und 350 µl RW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben. Wie zuvor wurde bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss erfolgte der DNase-Verdau nach Herstellerangaben für 15 min bei RT und ein weiterer Zentrifugationsschritt, wie im vorherigen Schritt. Die Säule wurde in ein neues *Collection tube* gesetzt, mit 500 µl RW1-Puffer und 2x mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 1 min. Die Säule wurde erneut in ein neues *Collection tube* gesetzt und offen bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Für die Elution wurden 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und für 10 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die RNA eluiert und im *Nanodrop*-Messgerät photometrisch quantifiziert.

Nukleinsäuren absorbieren im UV-Bereich aufgrund ihrer aromatischen Ringsysteme und besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, sodass die Konzentration nach Messung der OD bei dieser Wellenlänge bestimmt werden kann. Außerdem wird simultan eine weitere photometrische Messung bei 280 nm durchgeführt, um den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren zu bestimmen. Mittels des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  der gemessenen Werte wird somit der Grad der Verunreinigung kalkuliert. Oft sind die Nukleinsäuren durch Proteine, organische Komponenten etc. kontaminiert. Abschließend wurde die RNA bei -20 °C eingefroren und gelagert.

### 2.2.5.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Die isolierte RNA (siehe 2.2.5.1) kann durch reverse Transkription mithilfe eines Enzyms in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Als reverse

Transkriptase diente hier das in *E. coli* synthetisch hergestellte Enzym aus dem Retrovirus MMLV (*monolely murine leukemia virus*). Dieses synthetisiert die Reaktion von einzelsträngiger (*single stranded*, ss) RNA oder DNA effizient zu cDNA, sodass bei Vorliegen von Primern aus z.B. mRNA cDNA hergestellt wird.

Es wurden jeweils 500 ng RNA in RNase-freien Wasser auf einen Ansatz von 10 µl verdünnt. Nach Zugabe von 1 µl *Random Primer* wurde die Primer-Hybridisierung für 10 min bei 65 °C durchgeführt. Danach wurden 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl DNTP-Mix, 1 µl MMLV-Enzym, 0,5 µl RNasin und 2,5 µl RNase-freies Wasser zu jedem Reaktionsansatz gegeben. Die Elongation des Primers erfolgte anschließend bei 42 °C für 1 h. Im letzten Schritt wurde die Inaktivierung der Enzymreaktion bei 70 °C für 15 min durchgeführt und die Proben auf 4 °C für 10 min abgekühlt. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.5.3 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde zunächst, wie in 2.2.5.1-2.2.5.2, die RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben, um im Anschluss daran eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchführen zu können. Diese ermöglicht neben der Vervielfältigung der DNA die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte aufgrund von Fluoreszenz-Messungen in Echtzeit (*real time*). Dabei nimmt die Fluoreszenz des interkalierenden DNA-Farbstoffs *Brilliant SYBR Green* proportional zur Menge des PCR-Produkts zu.

Die qRT-PCR erfolgte in 96 well-Platten mit 5 µl cDNA der zu analysierenden Probe sowie 15 µl eines Reaktionsansatzes, der sich wie folgt zusammensetzt: 12,5 µl *Brilliant Sybr Green*, 2 µm des Primers des Zielgens (*gene of interest*) (siehe Tab. 3), 0,3 µl ROX Referenzfarbstoff sowie 4,7 µl RNase-freies Wasser. Der ROX Referenzfarbstoff diente dabei zur Ermittlung des Schwellenwertes sowie zur Normalisierung der Fluoreszenz. Als Haushaltsgen (*housekeeping gene*) wurde Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente als Doppelansatz der Reaktionsansatz mit Wasser anstelle der cDNA. Sie wurde zum Nachweis von Kontaminationen oder der Bildung von Primerdimeren eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde cDNA aus nativen humanen Schweißdrüsen verwendet, die von unterschiedlichen Spendern stammte. Im Stratagene Mx3000p Cyler wurden 40 Amplifikationsschritte durchgeführt. Die Aktivierung der *Hot Start* Polymerase erfolgte

zunächst bei 95 °C für 30 sek, die Primer-Hybridisierung bei 58 °C für 60 sec sowie die Elongation bei 72 °C für 30 sek mit jeweils 40 Wiederholungen. Abschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durch den kontinuierlichen Anstieg der Temperatur auf 95 °C durchgeführt, um Auskunft über die Spezifität der PCR-Reaktion zu erhalten.

Zur quantitativen Auswertung wurde die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode verwendet, d.h. zunächst wurden die Mittelwerte der Ct's (*cycle threshold*, Schwellenwertzyklus der exponentiellen Phase) im Bezug zum Ct-Wert des G6PDH-Referenzgens gesetzt und zur Berechnung des relativen Genexpressionslevels/G6PDH die Formel  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  mit

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (housekeeping gene)}$$

angewendet. Durch die Berechnung der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte mit der Formel

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (behandelt)} - \Delta\text{Ct (unbehandelt)}$$

wurden einzelne Gruppen (z.B. 3D Modell und *in situ* Schweißdrüse) durch die Anwendung der Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  miteinander verglichen.

#### **2.2.5.4 Genexpressionsanalyse mittels Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung**

Die Sequenzierung des Gesamt-Transkriptoms wurde mittels der Next Generation Sequenzierungs-Technologie (*next generation sequencing*, NGS) von der Firma StarSEQ durchgeführt. Diese stellt eine exzellente Methode zur zeitgleichen Analyse tausender exprimierter Gene der untersuchten Zellen dar. Dabei revolutionierte die NGS-Methode die traditionellen Verfahren der DNA-Sequenzierung wie die Standard-Didesoxymethode nach Sanger, da ein Hochdurchsatz möglich ist.

Die isolierte RNA der zu analysierenden Proben wurde durch reverse Transkription zunächst in cDNA umgeschrieben, um anschließend in der Illumina-NGS Technologie sequenziert zu werden. Zu den Schritten der NGS-Technologie gehören: (1) die Herstellung der DNA-Bibliothek, (2) die parallele, klonale Amplifikation der DNA und (3) die Sequenzierung. Dabei ist die Sequenzierung eine *sequencing-by-synthesis* Methode, da die Detektion beim Einbau der einzelnen Nukleotide erfolgt. Diese Nukleotide sind an Fluorophorgruppen gekoppelt (Bentley *et al.*, 2008). Anschließend wurde mithilfe spezieller Programme die Datenanalyse durchgeführt, die die gelesenen Fragmente (*Reads*) in einem *Alignment*-Verfahren dem humanen Referenzgenom zuordnet. Dieser Prozess wird als *Read Mapping* bezeichnet. Die

Auswertung und die Quantifizierung der Genexpressionsdaten erfolgte dabei nach der Anzahl der Fragmente zum passenden (*mapped*) Genlocus der Referenz in der Einheit FPKM. Diese steht für die Einheit *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads* (Trapnell *et al.*, 2010). Dabei wurde die Anzahl der *Reads* auf die Länge des sequenzierten Gens (*gene length*) normiert, da sonst Gene mit einer höheren Basenzahl mehr Fragmente pro *Reads* und *Counts* als kürzere Gene bei identischer Genexpression haben würden. Die Diagramme der Sequenzierungsdaten wurden somit in FPKM dargestellt.

Bei der Analyse wurden unterschiedliche Proben auf ihr Gesamt-Transkriptom untersucht. Es wurden sowohl native Schweißdrüsen als auch 3D Modelle der ekkrinen Schweißdrüse analysiert. Dabei wurden gesamte native Drüsen mit Coil- und Dukt-Kompartiment („nativ gesamt“) sowie die einzelnen Kompartimente des Coils oder des Dukts in der NGS-Analyse ausgelesen. Ebenfalls wurden die drei Ausführungsformen der 3D Modelle (Co-Kultur, Coil, Dukt) auf ihre Genexpression untersucht, die entweder nur mit Kultivierungsmedium oder mit ACh cholinerg stimuliert wurden. Außerdem wurde Humanhaut mitgeführt, um die spezifischen Gene der Schweißdrüse identifizieren zu können. So wurden die FPKM-Werte der Proben mit den FPKM-Werten der Vollhaut normiert. Mithilfe dieser Analyse wurden Schweißdrüsen-spezifische Gene identifiziert sowie der Einfluss durch die cholinerge ACh-Stimulation analysiert.

## 2.2.6 Proteinbiochemische Analysen

### 2.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Analyse der Proteinexpression wurden spezifische Proteine in Geweben, Zellen und 3D Modellen der Schweißdrüse mithilfe von indirekten Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen und lokalisiert. Diese Methode beruht auf der Antigen-Antikörper-Bindung, d.h. der Primärantikörper bindet spezifisch an das Antigen der Zielzelle. Der Sekundärantikörper mit gebundenem Fluorochrom bindet wiederum an den Primärantikörper. Nach Anregung wird diese spezifische Bindung sichtbar gemacht.

Zum Erhalt der Proteine in ihrem ursprünglichen Zustand wurden die Proben je nach Art des Schnittpräparats mit -20 °C gekühltem Aceton für 10 min oder mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Bei der Färbung

des *whole mount*-Gesamtpräparats wurde ausschließlich PFA zur Fixierung verwendet. Die Schnittpräparate wurden je nach Antikörper mit PFA oder mit Aceton fixiert. Die Proben wurden nach der Fixierung 2x mit PBS gespült und zur Sättigung unspezifischer Bindestellen mit der Blockierungslösung behandelt. Die Blockierung und Permeabilisierung erfolgte mit 10 % normalen Ziegen Serum und 0,1 % TritonX-100 in PBS für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen wurden die Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tab. 4) in *Dako Antibody diluent* gegeben und über Nacht (üN) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µg/ml Zellkernfarbstoff DAPI sowie der zum Primärantikörper korrespondierende Sekundärantikörper (siehe Tab. 5) nach mehrmaligem Spülen der Proben mit PBS zugegeben und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden erneut gewaschen, die Schnittpräparate mit *Cytoseal* eingedeckelt und in einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Wurden die 3D Modelle, wie zuvor beschrieben, *whole mount* gefärbt, wurden die Proben nicht eingedeckelt, um die Struktur der Sphäre zu erhalten.

Bei jeder Fluoreszenzfärbung wurden entsprechende Kontrollen mitgeführt, d.h. Negativ- und Positivkontrollen. Hautschnitte mit ekkrinen Schweißdrüsen dienten als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde die Färbung am Hautschnitt ohne den Primärantikörper durchgeführt, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen. Hier wurde nur der entsprechende Sekundärantikörper verwendet. Die Negativ- und die Positivkontrolle wurde sowohl am Hautschnitt als auch am Zielobjekt angefertigt. Dabei soll die spezifische Färbung am Zielobjekt gewährleistet werden. Die Kontrollen dienen außerdem zur Einstellung der Belichtungszeit.

#### **2.2.6.2 Durchflusszytometrie**

Zur weiteren Charakterisierung der Schweißdrüsenzellen wurde die Proteinexpression anhand Schweißdrüsen-spezifischer Marker mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurde wie in 2.2.6.1 die indirekte Immunfluoreszenz-Methode verwendet, die standardmäßig mit einem Primär- und einem konjugierenden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper durchgeführt wird (Tab. 4+5). Da eine Vielzahl der Marker keine Oberflächenantigene, sondern intrazelluläre Proteine, darstellen, wurden die Zellen vor der Antikörper-Inkubation permeabilisiert. Zu den Oberflächenantigenen zählen die *cluster of differentiation* (CD) Moleküle, wie CD200. Die Fluoreszenz-markierten Zellen passieren in diesem Messverfahren einen Laserstrahl. Durch die Anregung des Laserstrahls wird ein Teil des auftreffenden Lichts gestreut und detektiert. Dies lässt

auf bestimmte Eigenschaften der Zellen wie die Form, die Struktur (Granulität) und/oder Fluoreszenzfärbung der Zellen schließen. Dabei werden die positiv-markierten Zellen quantifiziert und der prozentuale Anteil der Zellpopulation bestimmt.

Zur Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde zunächst eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.2.1-2.2.2.2). Die verwendeten Reagenzien und Medien wurden auf 4°C gekühlt. Die Zellen wurden anschließend auf ca.  $2-5 \times 10^5$  Zellen verdünnt und 2x mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen unter leichtem Vortexen in 250 µl „BD Cytotfix/Cytoperm“ suspendiert. Dann erfolgte die Permeabilisierung für 20 min bei 4°C, erneut 2x Waschschrirte mit PBS und das Dekantieren des Überstands. Im darauffolgenden Schritt wurden die Zellen mit 10 % normalen Ziegen Serum für 30-45 min bei 4°C blockiert, um unspezifische Bindestellen zu sättigen. Danach wurden die Zellen 2x mit „BD Perm/Wash Buffer“ gewaschen. Die Zellen wurden auf Eppendorf-Probengefäße verteilt und ca.  $3 \times 10^6$  Zellen mit dem jeweiligen Primärantikörper für 60 min bei 4°C inkubiert. Nach 2x Waschen mit „BD Perm/Wash Buffer“ wurde der Sekundärantikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Abschließend wurde mit „BD Perm/Wash Buffer“ gespült und die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

Neben den zu analysierenden Proben wurden unterschiedliche Kontrollen mitgeführt. Dazu zählen eine ungefärbte Probe zur Analyse der Eigenfluoreszenz der Zellen. Außerdem wurde eine Propidiumiodid (PI)-Kontrolle hergestellt, die die vollständige Permeabilisierung der perforierten Zellen nachweist. Zur Identifikation der unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers wurden die Negativkontrollen nur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper ohne Verwendung des Primärantikörpers gefärbt. Diese wurden zur Berechnung des prozentualen Anteils der positiven Zellen in einer Zellpopulation verwendet. Mithilfe der „BD Accuri C6 Plus“ Software wurden die Daten analysiert.

Dazu zählten die Auswertung der Daten, die bestimmte Zelleigenschaften, wie die Größe der Zellen, die Granulität und insbesondere die Fluoreszenzintensität, graphisch darstellten. Die Daten wurden standardmäßig im Histogramm sowie im sog. *Dot Plot* (Punkt-Diagramm) gezeigt. Im Histogramm wurde auf der x-Achse die logarithmische Fluoreszenzintensität eines Antikörpers in Abhängigkeit zur Häufigkeit eines Ereignisses (Anzahl der Zellen) auf der y-Achse aufgetragen. Im Punkt-Diagramm wurde jedes einzelne Ereignis als Punkt dargestellt, welches in

Abhängigkeit zur Fluoreszenzintensität auf der x-Achse und zur Größe auf der y-Achse gezeigt wurde. Die Kontrollen wurden dabei zur Berechnung der prozentualen Anteile der positiv-markierten Zellen verwendet.

### **2.2.6.3 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Proben der zerkleinerten Haut, der 2D Kulturen sowie der 3D Modelle bei 13.000 rpm für 5 min pelletiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde 1 ml SDS-Lysepuffer zugegeben, resuspendiert und die Probe bei Bedarf mit einer Pistille homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min bei 95 °C denaturiert und erneut zentrifugiert. Die Probe wurde dann auf Eis gesetzt und der Überstand unverdünnt oder verdünnt zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration wurde mithilfe der Methode nach Popov bestimmt. Vorteil dieser Methode sind vor allem, dass die eingesetzten Farbstoffe – im Gegensatz zum Verfahren nach Lowry oder Bradford – nicht mit anderen Detergenzien (SDS, DTT,  $\beta$ -Mercaptoethanol) reagieren und die Farbreaktion stören. Diese Reaktion beruht auf der Ausfällung von Proteinen als unlöslicher Farbstoff, die von dem Farbstoff Amidochwarz 10B in saurem Milieu gebunden werden und als Komplex ausfallen. Nach dem Waschen mit Natronlauge (NaOH) wird dieser Komplex wieder gelöst und kann mithilfe einer photometrischen Messung bei 620 nm anhand eines Standards quantifiziert werden. Bovines Serumalbumin (BSA) dient dabei als Extinktionsstandard, der mit aufsteigender Konzentration mitgeführt wird und nach linearer Regression zur Konzentrationsbestimmung verwendet wird.

Die hergestellten Lysate wurden zunächst mit 375  $\mu$ l Popov-Lösung III gemischt, bei 13.000 rpm für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann mit 500  $\mu$ l Popov-Lösung I gewaschen, erneut durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand abgegossen. Dieser Waschvorgang wurde wie zuvor beschrieben zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Pellets für 5 min offen bei RT getrocknet und mit 500  $\mu$ l 0,1 M NaOH aufgelöst. Im Anschluss erfolgte die photometrische Messung von 100  $\mu$ l der Probe, die in eine 96 well-Mikrotiterplatte überführt wurde, bei 620 nm. Mithilfe der linearen Regressionsgeraden des BSA-Standards wurden die Konzentrationen kalkuliert.

#### **2.2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Ein analytisches Verfahren zur Trennung von Proteinen oder Proteingemischen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld spiegelt die Methode der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wieder. Die Methode wurde von Lämmli entwickelt. Die Proteine werden mithilfe des Detergens SDS effizient gebunden, deren Eigenladungen überdeckt und durch Aufkochen der Proben werden die Strukturen der Proteine linearisiert sowie denaturiert. Infolgedessen wandern die Protein-SDS-Mizellen mit ihrer konstant negativen Ladung im Polyacrylamidgel proportional zu ihrer Molekülmasse.

Das Polyacrylamidgel stellt ein Gradientengel mit einem Acrylamid-Gradienten dar, welches sich aus einem Sammel- und Trenngel zusammensetzt. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert, bevor sie in das Trenngel einwandern. Dort findet die Auftrennung der Proteine statt. Meist werden Gradientengele mit einem Acrylamid-Anteil von 4-12 % verwendet, die Proteine mit einer Molekülmasse von 15 kDa bis 260 kDa bei der Verwendung von 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)-Puffer auftrennen. Hier wurden ebenfalls vorgefertigte 4-12 % NuPAGE Bis-Tris Gele von der Firma Invitrogen verwendet. Es wurden jeweils 10 µg der Proteinlysate (siehe 2.2.6.3) mit 4x SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Überstände der erhitzten Proben wurden bei 200 V für 1 h nach Zugabe des Laufpuffers im elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Bestimmung der Proteingröße werden bei jedem Lauf Standards, wie der *See blue Marker* und der *Magic Mark Marker*, mitgeführt.

#### **2.2.6.5 Western Blot-Analyse und Immundetektion immobilisierter Proteine**

Nach der Gelelektrophorese und der Trennung der Proteine werden diese aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und damit immobilisiert. Dies geschieht ebenfalls in einem elektrischen Feld. Anschließend können mithilfe von Antikörpern (siehe Tab. 4) spezifisch Proteine nachgewiesen werden.

Zum Transfer der Proteine wurden Schwämme, die mit Transfer-Puffer getränkt wurden, und ein Whatman-Papier auf die Anodenplatte der *Blotting*-Apparatur gelegt. Das Gel, die Membran, ein zusätzliches Whatman-Papier sowie weitere Schwämme wurden anschließend aufgelegt und die Apparatur in die Kammer eingeklemmt. Die

Kammer wurde dann mit Laufpuffer befüllt und der Proteintransfer bei 170 mA für 2 h durchgeführt. Nach Transfer der Proteine wurde die Membran für 1-2 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert. Dabei wurde der Transferprozess überprüft und die Proteinbanden sichtbar gemacht. Dieser Vorgang ist reversibel und entfärbt die Membran nach Waschen mit destilliertem Wasser wieder.

Im Anschluss wurde die Membran mit 5 % Milchpulver-Blockierungslösung für 1 h bei RT auf einem rotierenden Schüttler behandelt und freie Bindestellen geblockt. Die Membran wurde in TBST-Puffer gewaschen und dann mit den entsprechenden Primärantikörpern in Blockierungslösung  $\mu$ N bei 4 °C inkubiert. Als Ladekontrolle wurde stets ein ubiquitäres Protein mitgeführt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) stellte hier die Kontrolle dar. Anschließend wurde die Membran 3x mit TBST gewaschen, für 1 h bei RT mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper behandelt und erneut mit TBST gespült.

Zum Nachweis der spezifischen Protein-Antikörper-Bindung wurde ECL Detektionsreagenz im Verhältnis 1:1 vermischt und für 2 min auf die Membran gegeben. Nach Einschweißen der Membran und der Überführung dieser in eine Filmkassette wurde ein Röntgenfilm für eine definierte Expositionszeit auf die Membran gelegt. Diese Expositionszeit ist abhängig von der Signalintensität. In der Dunkelkammer erfolgten anschließend die Entwicklung sowie die Fixierung des Röntgenfilms. Die quantitative Messung der Farbdichte der Banden (Densitometrie) wurde mithilfe des Programms *TotalLab Quant 100* durchgeführt. Nach Subtraktion des Hintergrunds erfolgte dann die Normalisierung der Proteinbanden-Intensitäten. Durch das Dividieren der Proteinbanden-Intensität des *Protein of Interest* mit der Proteinbanden-Intensität der Ladekontrolle GAPDH wurde die Proteinmenge der Proben quantitativ bestimmt.

### **2.2.7 Calcium Flux Assay zur Analyse des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signallings**

Als *proof-of-concept* wurde das physiologische Reaktionsvermögen der ekkrinen Schweißdrüsenzellen mithilfe des Calcium Flux Assays analysiert. Wie in 1.2.2.3-1.2.2.4 beschrieben, spielt das Ca<sup>2+</sup>-Signalling in der Schweißdrüse eine entscheidende Rolle beim Sekretionsmechanismus. Der Assay wurde an primären ekkrinen Schweißdrüsenzellen in der 2D Kultur als auch im 3D Modell angewendet.

Für die Experimente wurden schwarze 96 well-Mikrotiterplatten mit transparenten Boden sowie phenolrotfreies Medium verwendet. In diese Platten wurden die 2D Kulturen eingesät bzw. die 3D Modelle überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Kulturen mit 100 µl Fluo-4 AM-Inkubationsmedium, welches 4 µM Fluo-4 AM und 2,5 mM Probenezid enthält, für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach diesem Inkubationsvorgang wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die De-Esterifizierung für 2 h mit der „De-Esterifizierungslösung“, d.h. die Esterbindungen des Fluoreszenzindikators Fluo-4 AM werden von intrazellulären Esterasen gespalten. Somit kann der Indikator von  $\text{Ca}^{2+}$  unter Freisetzung von Fluoreszenz gebunden werden. Durch die Zugabe von Probenezid wird der Ausstrom des Farbstoffs verhindert.

Nach der Inkubation erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission von 535 nm im Tecan-Mikrotiterplattenmessgerät. Zunächst wurde die Basisfluoreszenz für 4 min detektiert. Die Zellen wurden im Anschluss daran stimuliert bzw. inhibiert. Bei Inhibition der Zellen mithilfe des muskarinen Antagonisten Glykopyrrolat wurde das inhibierende Reagenz für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit den stimulierenden Substanzen, z.B. mit ACh, Pilocarpin, ATP oder Kaliumsulfat, behandelt und die Fluoreszenz als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) für 20 min gemessen.

Die Änderung der Fluoreszenzintensitäten ( $\Delta F$ ) wurden nach der Formel

$$\Delta F = (F_{\max} - F_0)/F_0$$

mit  $F_{\max}$  als maximale Fluoreszenz,  $F_0$  als Basisfluoreszenz kalkuliert. Für jede Behandlung wurden 6 biologische Replikate eingesetzt.

### **2.2.8 Integration von 3D Co-Kultur Modellen in ein Phenion-Vollhautmodell**

Im Abschnitt 1.3.2 wurden unterschiedliche Ausführungen von 3D Modellen erwähnt, die meist mit einem *scaffold*, einer Matrix, etabliert wurden. Ebenfalls existieren solche *in vitro* Modelle, die die Epidermis oder die Vollhaut, die sowohl eine Epidermis als auch eine Dermis besitzen, rekonstruieren. Diese werden auch als Vollhautäquivalente bezeichnet. Diese besitzen keine Hautanhangsgebilde, wie etwa Schweißdrüsen. Ein solches Vollhautmodell stellt das Phenion-Vollhautmodell, welches mit einer Kollagenmatrix hergestellt wird, dar.

Zur Integration von 3D Modellen der Schweißdrüse in ein Vollhautmodell wurden 3D Co-Kultur Modelle verwendet. Die Vollhautmodelle wurden nach dem Patent WO 2006/019147 A1 hergestellt, welches in Diekmann *et al.* (Diekmann *et al.*, 2016) angewendet wurde. Auf Basis dieses Verfahrens wurde auch das Vollhautmodell mit integrierten 3D Modellen der Schweißdrüse entwickelt. Dabei wurden die 3D Co-Kultur Modelle wie in 2.2.3.1 beschrieben mit 25.000 Zellen/Kultur hergestellt und in die Dermissschicht dieses Vollhautäquivalents eingesät. Dazu wurden 3D Co-Kultur Modelle in die Matrix der Dermis, die mit Fibroblasten vorkultiviert wurde, integriert. Anschließend wurde das Modell für 16 Tage kultiviert, welches in dieser Zeit ein Dermisäquivalent ausbildet. Nach Aussaat der Keratinozyten erfolgte die weitere Kultivierung der Modelle für weitere 11 Tage an der sog. *Air-Liquid-Interface*. Diese bilden dann die Epidermis mit einer verhornten Gewebeoberfläche aus. Im Anschluss an die Kultivierung und Integration der 3D Modelle der Schweißdrüse erfolgte die morphologische sowie immunhistochemische Begutachtung der Modelle.

### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Die durchgeführten Experimente wurden nach dreimaliger unabhängiger Ausführung mithilfe der Software GraphPad Prism statistisch ausgewertet und Diagramme erstellt. Dabei diente der Mittelwert der Daten sowie der Standardfehler (SEM) als Grundlage für die Berechnungen der Signifikanzen. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde standardmäßig mit  $p < 0,05$  als signifikant,  $p < 0,01$  als hochsignifikant und  $p < 0,001$  als höchstsignifikant festgelegt. Der Student's t-Test wurde für den Vergleich von zwei Datenreihen angewendet. Nichtparametrische Daten wurden mit dem Mann-Whitney U-test ausgewertet. Wurden mehr als zwei Datenreihen miteinander verglichen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (*One way ANOVA*) mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test (Signifikanzlevel mit  $\alpha = 0,05$ ) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifikation grundlegender Eigenschaften primärer ekkriner Schweißdrüsenzellen

Humane ekkrine Schweißdrüsenzellen wurden in einer umfassenden Analyse auf unterschiedliche Parameter (Wachstumsverhalten, Morphologie, Histologie u.a.) in der 2D Kultur und im 3D Modell *in vitro* untersucht. Diese Charakterisierung diente der Identifikation grundlegender Eigenschaften dieser Zellen. Außerdem wurden die Zellen des Coils und des Dukts *in vitro* miteinander verglichen. Durch die Identifikation und die Charakterisierung der Zelltypen konnten Unterschiede innerhalb der Coil- und Dukt-Zellen und innerhalb der Kultivierungsmethoden verdeutlicht werden.

##### 3.1.1 Migrationsverhalten von Schweißdrüsenzellen

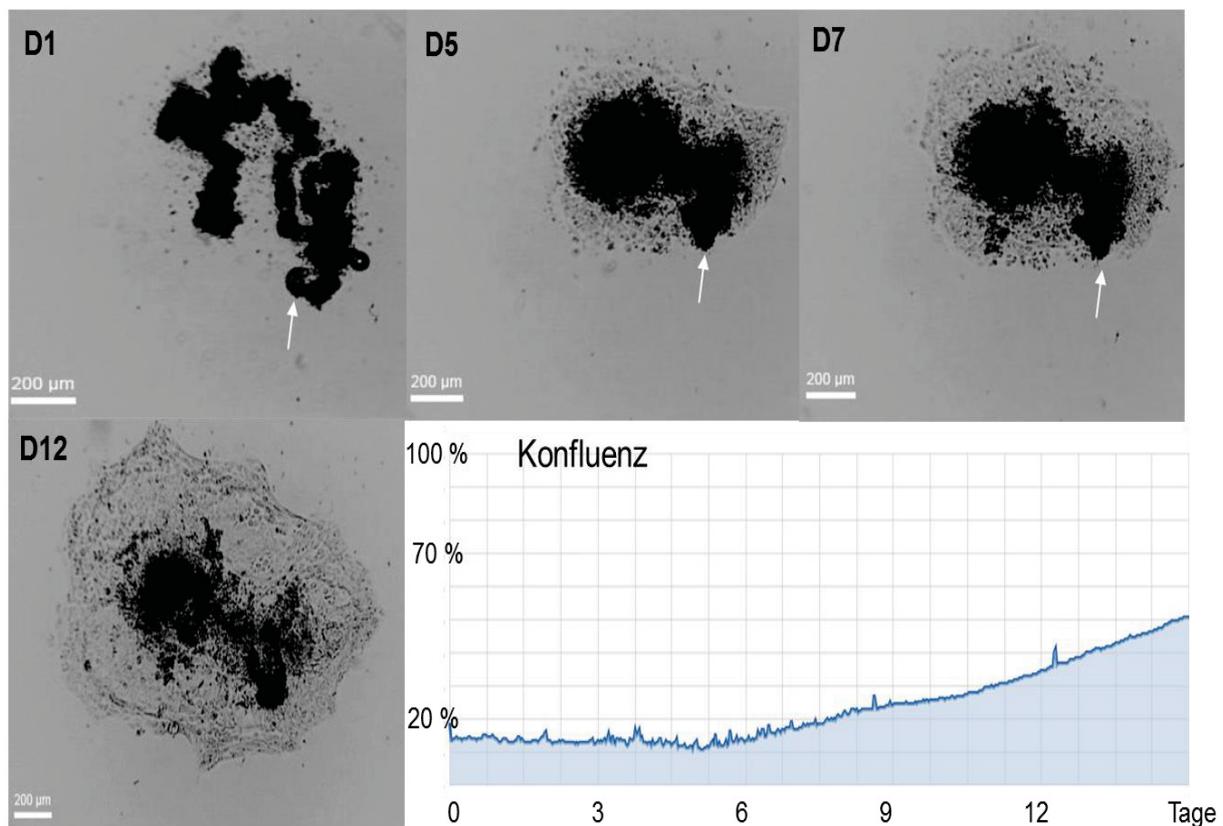
Um das Migrationsverhalten auswachsender ekkriner Schweißdrüsenzellen aus nativem (*in situ*) Gewebe der Schweißdrüse zu analysieren, wurden mikroskopische Aufnahmen im Zeitraffer erzeugt. Dazu wurden ekkrine Schweißdrüsen, die zuvor enzymatisch verdauter Humanhautbiopsie isoliert wurden (siehe 2.2.1), zunächst in Kollagen Typ I-beschichtete Zellkulturflaschen überführt. Zur getrennten Betrachtung des Migrationsverhaltens auswachsender Zellen des sezernierenden Coils und des ausführenden Dukts wurden diese separiert und einzeln kultiviert. Somit wurde das Migrations- und Wachstumsverhalten sowohl der intakten gesamten Drüse mit Coil und Dukt als auch der einzelnen, voneinander getrennten Kompartimente analysiert.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass das *in situ* Gewebe mit zunehmendem Auswuchs der Zellen immer kleiner wurde. Dies spricht stark für den Auswuchs der Zellen aus dem Ursprungsgewebe und insbesondere für deren Fähigkeit zur Migration. Jedoch zeigte die Zeitraffermikroskopie je nach Zelltyp Unterschiede im Migrationsverhalten der ekkrinen Schweißdrüsenzellen beim Auswuchs aus dem nativen Gewebe. Migrierende Zellen aus dem Coil der Schweißdrüse (Abb. 7) konnten schon nach 1 Tag (D1) beobachtet werden, wohingegen Zellen aus der gesamten Drüse (Abb. 6) und Zellen aus dem Dukt (Abb. 8) erst an D4 migrierten und proliferierten.

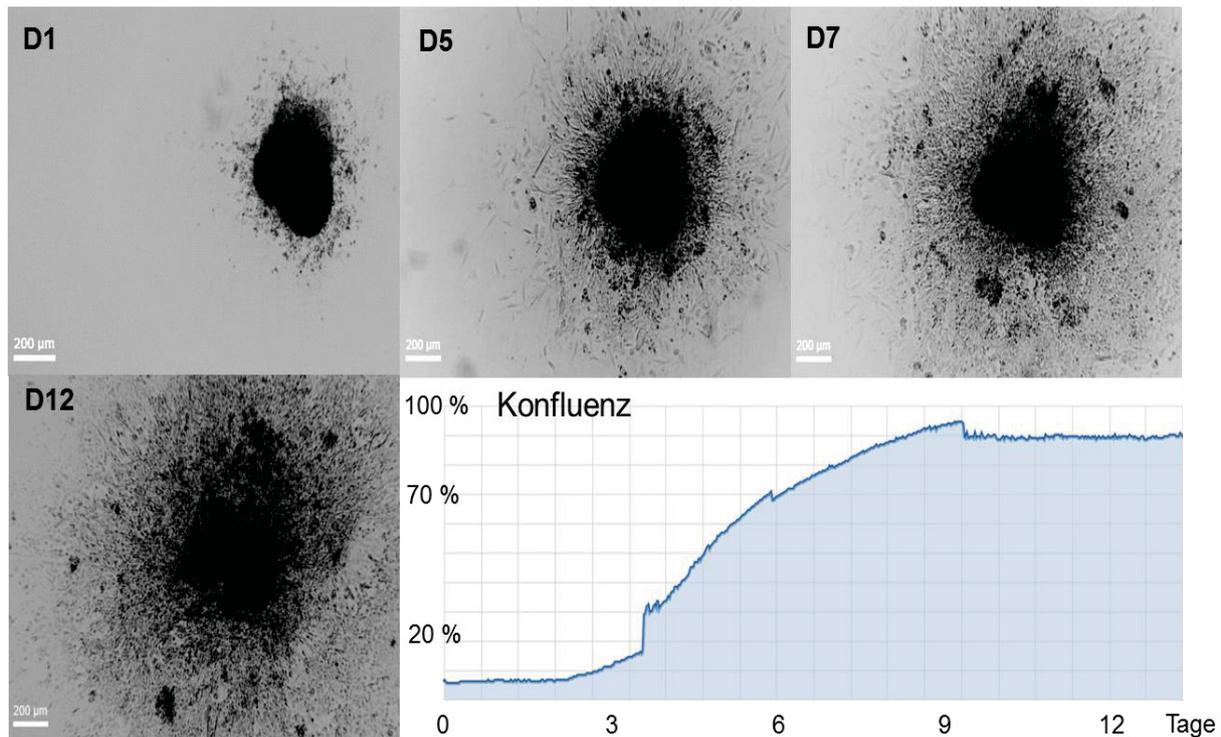
Weiterhin ist auch die kontinuierliche Teilung der Zellen, die Proliferationskapazität, die anhand der Konfluenz bestimmt wurde, nach ihrem Auswuchs aus der adhären

Drüse je nach Zelltyp zu unterscheiden. Dabei erreichten Coil-Zellen nach dem Adhären an D6 ca. 70 % Konfluenz. Hingegen zeigten Zellen des Dukts und Zellen der gesamten Drüse (Co-Kultur) wesentlich langsames Wachstum (Tab. 6).

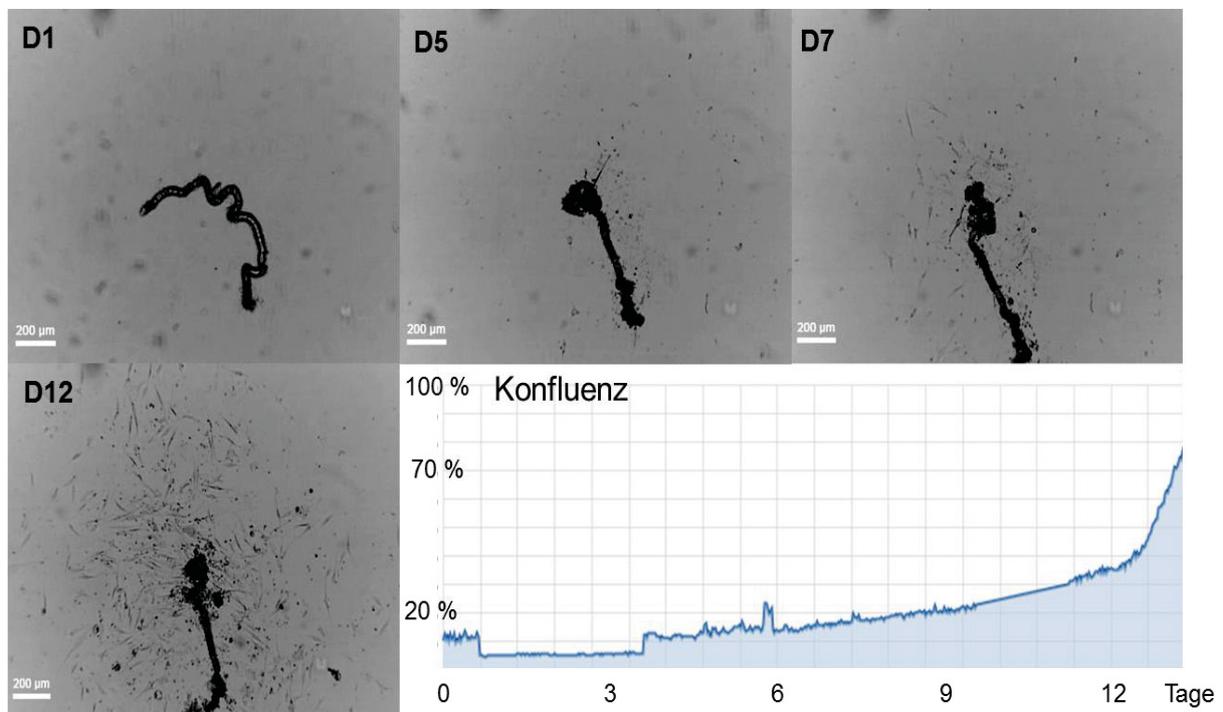
Bei näherer Betrachtung des Migrationsverhaltens der gesamten Drüse mit Coil und Dukt fällt außerdem auf, dass es aus dem Dukt-Kompartiment (Abb. 4, Pfeile) wesentlich langsamer zum *in vitro* Auswuchs kommt. Demzufolge sind Zellen des Dukts prozentual geringer in der resultierenden Zellpopulation der Co-Kultur vertreten.



**Abbildung 6: Zeitraffermikroskopie auswachsender Coil- und Dukt-Zellen aus einer *in situ* Schweißdrüse mit Coil- und Dukt-Kompartiment.** Die Migration der Zellen wird hier exemplarisch anhand der Aufnahmen an D1, D5, D7 und D12 gezeigt. Nach Isolation der Schweißdrüsen wurden diese zur Analyse des Migrationsverhaltens in Zellkulturgefäße überführt und hefteten am Boden der Zellkulturflasche an, sodass die Zellmigration beobachtet werden konnte. Dukt- und Coil-Zellen wuchsen aus dem Gewebe aus und generierten einen Zellrasen. Aus dem Dukt (Pfeile) migrierten die Zellen wesentlich langsamer. Die Verlaufskurve zeigt eine linear ansteigende Konfluenz, die anhand der grafischen Auswertung der Aufnahmen automatisch bestimmt wurde. Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.



**Abbildung 7: Zeitraffermikroskopie auswachsender Coil-Zellen aus einem *in situ* Coil-Kompartiment.** Hier konnte die Migration von Coil-Zellen aus einem adhärenen *in situ* Coil beobachtet werden. Die Darstellung der Konfluenz durch die automatische graphische Auswertung der Aufnahmen zeigt einen starken, exponentiellen Anstieg der Proliferation mit einer 70 %igen Konfluenz an D6 und einem Plateau ab D10. Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 8: Zeitraffermikroskopie auswachsender Dukt-Zellen aus einem *in situ* Dukt-Kompartiment.** Die Dukt-Zellen wuchsen langsam aus dem Dukt-Kompartiment und mit geringer Zelldichte aus. Sie zeigten an ca. D13 70 % Konfluenz. Die Verlaufskurve der Konfluenz ist zunächst linear und ab D12 steigt diese exponentiell an. Die Konfluenz wurde durch die graphische Auswertung der Aufnahmen automatisch bestimmt. Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

**Tabelle 6: Übersicht der Migrationsfähigkeiten und des Proliferationsverhaltens der ekkrinen Schweißdrüsenzellen aus der nativen Schweißdrüse.**

Kompartiment	Adhäsion an	70 % Konfluenz an	Kurvenverlauf
Coil und Dukt (Co-Kultur)	D4	> D14	Linear
Coil	D1	D6	Exponentiell mit Plateau ab D10
Dukt	D4	D13	Zunächst linear, ab D12 exponentiell

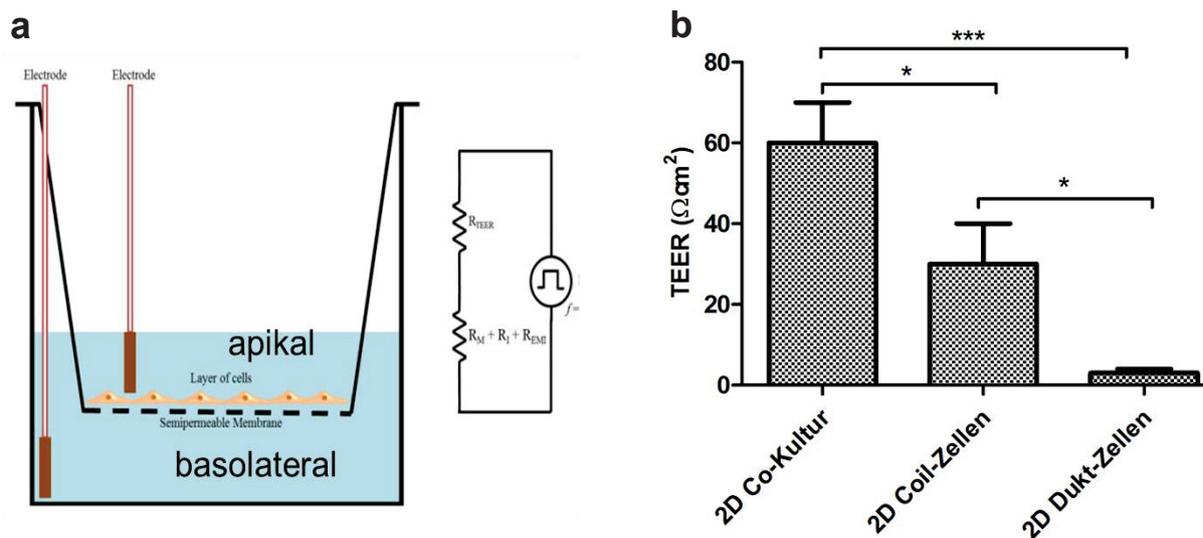
Anhand der Zeitraffermikroskopie konnte die *in vitro* Migrationsfähigkeit von primären Schweißdrüsenzellen aus dem *in situ* Gewebe nachgewiesen werden. Die getrennte Kultivierung der Kompartimente ermöglichte die Migration und die Proliferation der Coil- und Dukt-Zellen getrennt voneinander zu analysieren. Es konnte veranschaulicht werden, dass die native Drüse mit zunehmender Kultivierungszeit an Größe und Dichte verlor. Zudem wurden unterschiedliche Wachstumseigenschaften der Zelltypen aufgezeigt, die sich im Adhäsionsverhalten, in der Geschwindigkeit des Auswuchses und in der Proliferationskapazität unterschieden.

### 3.1.2 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) von Schweißdrüsenzellen

Zur Untersuchung weiterer charakteristischer Eigenschaften der Schweißdrüsenzellen wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) *in vitro* analysiert. Dieses Charakteristikum kann Aufschluss über die Zell-Zell-Verbindungen geben, wie beispielsweise über die sog. *Tight Junctions*. Diese kommen vor allem in Endothel- und Epithelzellen vor. Der TEER ist außerdem gewebe- und zelltypspezifisch. Über diese Verbindungen werden parazellulär, d.h. über Zellzwischenräume, meist Ionen passiv entlang des elektrochemischen Gradienten ausgetauscht. Dies dient der Aufrechterhaltung sowie der Regulation der Barrierefunktion (Srinivasan *et al.*, 2015). Diese interzellulären Verbindungen spielen auch in der Schweißdrüse bei der Sekretion von Schweiß eine entscheidende Rolle (Li *et al.*, 2015; Wilke *et al.*, 2006).

Aufgrund des Aufbaus des Messsystems ist es allerdings nur möglich, den TEER eines Zellrasens und damit nur von 2D Zellkulturen – nicht von 3D Modellen – zu bestimmen. Jedoch stellen die Primärzellen die Grundlage für das 3D Modell der Schweißdrüse dar. Funktionale epitheliale Zellen bilden auf einer semipermeablen Membran einen

Zellrasen mit charakteristischer apikal-basaler Polarität aus. Bei der Messung werden dabei zwei Messgrößen bestimmt: die elektrische Membrankapazität (Ccl; bei Lipidmembrandoppelschichten immer etwa  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) sowie der TEER (in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Diese Größen basieren nach Anlegung einer Wechselspannung in Abhängigkeit zur Frequenz auf der elektrischen Impedanz (Wechselstromwiderstand, Z). Bei der Messung mehrerer Frequenzen ergibt sich somit ein Impedanzspektrum. Dieses Impedanzspektrum liefert sowohl Informationen zum TEER als auch zum Ccl.



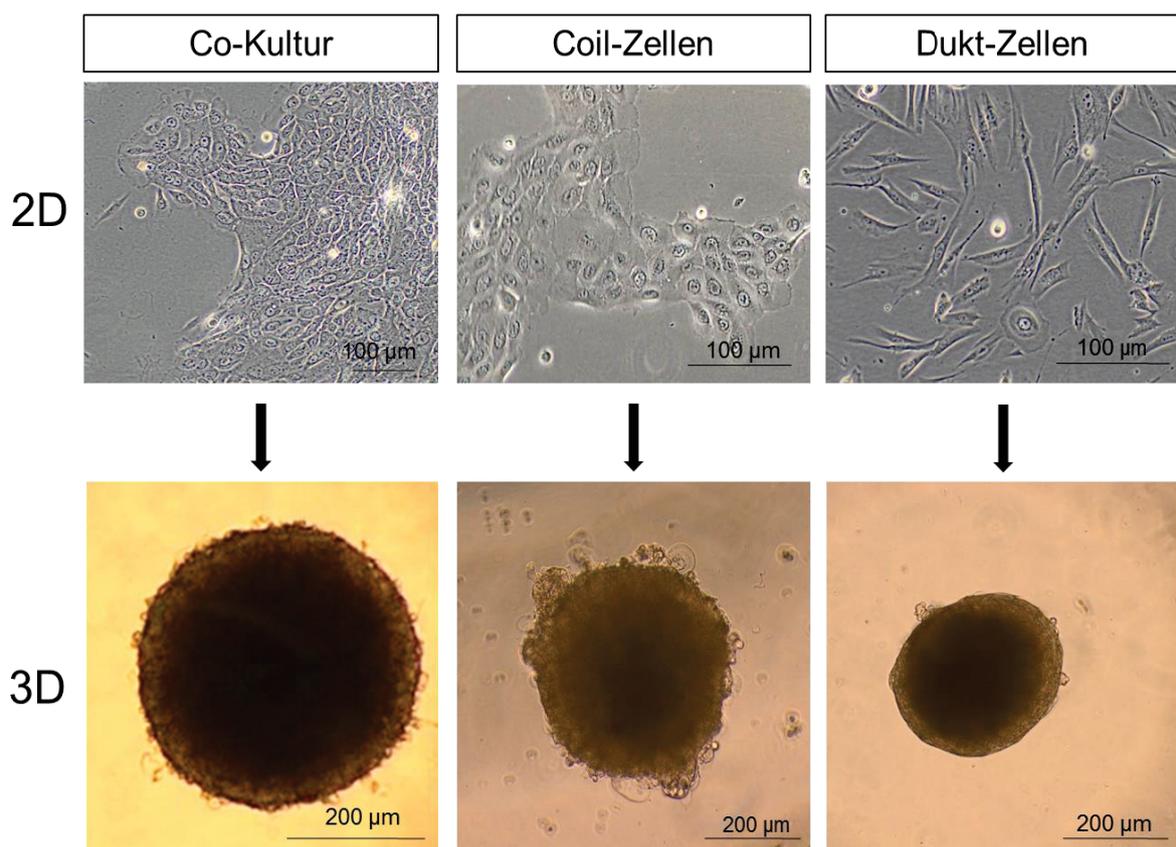
**Abbildung 9: Charakterisierung von Schweißdrüsenzellen anhand des TEER.** a) Aufbau des Messsystems mit zwei Elektroden und einer apikalen und basolateralen Messkammer, welche durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt werden. b) Darstellung des erreichten TEER-Werts von Schweißdrüsenzellen bei einer 100 %igen Konfluenz mit  $n=3$  (MW $\pm$ SEM in *One-way ANOVA* mit  $p<0,05$ (\*) $<0,01$ (\*\*) $<0,001$ (\*\*\*)).

Der TEER von primären Schweißdrüsenzellen wurde hier analysiert und quantitativ bestimmt, sodass weitere entscheidende Eigenschaften dieser Epithelzelltypen *in vitro* identifiziert wurden. Die 2D Co-Kultur erreichte einen Widerstandswert von bis zu ca.  $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Abb. 9b). Getrennt voneinander kultivierte Zellen der Kompartimente des Coils bzw. des Dukts zeigten geringere TEER-Werte mit ca.  $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in Zellen des Coils und ca.  $5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in Zellen des Dukts. Mithilfe dieses Messprinzips konnten *Tight Junctions* nachgewiesen und die Zelltypen der ekkrinen Schweißdrüse funktional differenziert werden. Da aktive aber auch passive Austauschprozesse von Ionen und anderen Molekülen bei der Bildung von Schweiß eine entscheidende Rolle in der Schweißdrüse spielen, bedarf es jedoch weiterer *in vitro* Analysen zur vollständigen Bestimmung der *Tight Junctions* von ekkrinen Schweißdrüsenzellen.

### 3.1.3 Morphologische Eigenschaften

Nach Migration der primären Schweißdrüsenzellen aus dem nativen Drüsengewebe und anschließender Proliferation der Zellen wurden diese nach Subkultivierung in das 3D Modell überführt. 3D Kultivierungsmethoden weisen umfassende Vorteile im Vergleich zur konventionellen 2D Kultur auf. Durch die Aggregation der Zellen in einer Sphäre und den damit einhergehenden Zell-Zell-Interaktionen wird die *in vivo* Situation nachgeahmt und die Differenzierung der Zellen induziert (siehe 1.3.2). Mithilfe der *Hanging drop*-Kultivierungsmethode wurden Zellen des Coils, des Dukts oder als Co-Kultur im 3D Modell auf ihre Morphologie analysiert.

Die 2D-kultivierten Schweißdrüsenzellen wiesen eine Pflasterstein-artige Struktur, die sog. *Cobblestone*-Morphologie, auf (Gao *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2008), welche in der 2D Co-Kultur und in 2D Coil-Zellen zu erkennen ist (Abb. 10).



**Abbildung 10: Morphologische Untersuchung von Schweißdrüsenzellen in der 2D Kultur und in 3D Modellen.** In der Hellfeldmikroskopie zeigten Schweißdrüsenzellen in der 2D Kultur eine *Cobblestone*-Morphologie, die v.a. in der 2D Co-Kultur und in 2D Coil-Zellen erkennbar wurde. 2D Dukt-Zellen wiesen eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Struktur auf. Die Sphären des 3D Co-Kultur Modells und v.a. des 3D Coil-Modells zeigten in der mikroskopischen Aufnahme fransige Strukturen im Randbereich. 3D Dukt-Modelle wiesen größtenteils eine klar abgrenzende äußere Membran auf. Maßstab entspricht 100 µm bzw. 200 µm.

Bei Betrachtung der 2D Dukt-Zellen konnte größtenteils eine Fibroblasten-ähnliche, spindelförmige Morphologie identifiziert werden. Diese unterschied sich stark von der Morphologie der Schweißdrüsenzellen in der 2D Co-Kultur und der 2D Coil-Zellen.

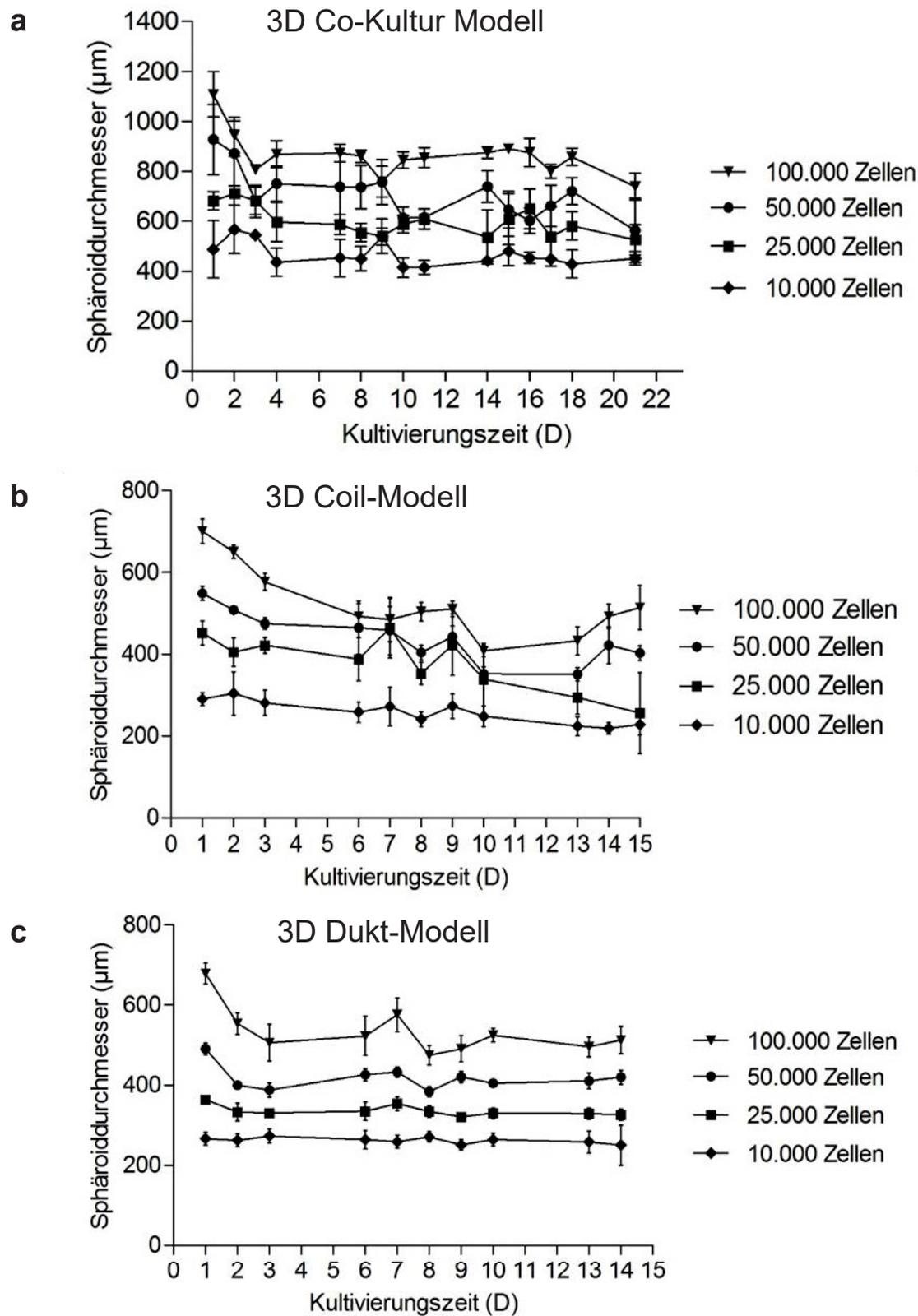
Die morphologischen Unterschiede der Zelltypen – der Coil-Zellen, der Dukt-Zellen und der Co-Kultur – wurden ebenfalls in den 3D Modellen der Schweißdrüse deutlich. Sie zeigten bestimmte Eigenschaften, wie die Bildung einer abgrenzenden äußeren Membran, die im 3D Dukt-Modell zu erkennen war. Im Randbereich des 3D Co-Kultur Modells und insbesondere des 3D Coil-Modells konnten fransige Strukturen beobachtet werden.

### **3.1.3.1 Analyse der Sphärengröße in Abhängigkeit zum Zelltyp, zur Kultivierungsdauer und zur Zellzahl**

Die Größe von 3D Modellen aus Zellen der Schweißdrüse wurde in Abhängigkeit zum Zelltyp, zur Kultivierungszeit und zur Zellzahl analysiert. Dabei wurden die 3D Modelle (Co-Kultur, Coil, Dukt) jeweils mit 10.000, 25.000, 50.000 und 100.000 Zellen pro Modell hergestellt und deren Durchmesser über die Zeit vermessen (Abb. 11).

Insgesamt wiesen 3D Co-Kultur Modelle (Abb. 11a) einen erhöhten Sphären-Durchmesser im Vergleich zu 3D Coil- (Abb. 11b) bzw. 3D Dukt-Modellen (Abb. 11c) auf. Dieser lag bei 3D Co-Kultur Modellen zwischen 500-1000  $\mu\text{m}$ . Im Vergleich dazu betrug der Durchmesser bei 3D Coil-Modellen 250-700  $\mu\text{m}$  und bei 3D Dukt-Modellen 280-700  $\mu\text{m}$ . Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der Zellzahl und dem Durchmesser der 3D Modelle nachgewiesen werden. In der Regel stieg der Durchmesser mit zunehmender Zellzahl. Auch die zunehmende Kultivierungsdauer hatte bei der Kultivierung zwar einen Einfluss auf den Durchmesser der 3D Modelle. Eine verlängerte Kultivierungszeit bewirkte jedoch tendenziell die leichte Abnahme des Sphärendurchmessers. Dies konnte vorwiegend bei der Aussaat einer hohen Zellzahl von > 50.000 Zellen/Kultur gezeigt werden.

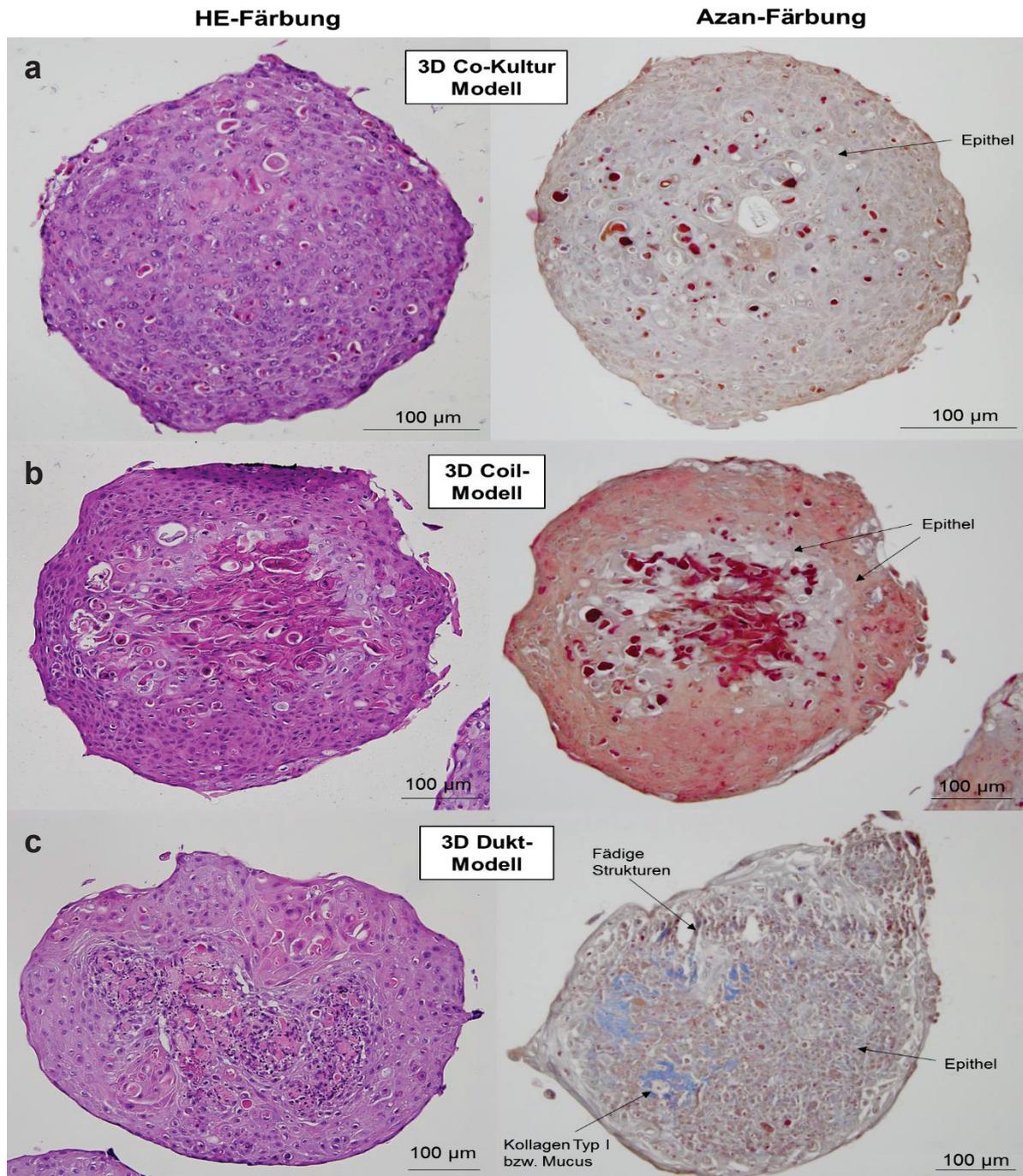
Der Standardfehler des Sphärendurchmessers betrug ca. 5-15 %, hingegen wiesen 3D Co-Kultur Modelle im Durchschnitt höhere Standardfehler auf. Weiterhin war nach einer Kultivierungsdauer von > D15 mit sehr hohen Verlusten der 3D Modelle zu rechnen. Aus diesem Grund war eine Langzeitkultivierung (> D15) mithilfe der *Hanging drop*-Methode nicht gut durchführbar. Beispielhaft wurde die Messung bis zu D21 nur für das 3D Co-Kultur Modell dargestellt.



**Abbildung 11: Analyse des Sphärendurchmessers von 3D Modellen der Schweißdrüse.** Die Analyse des Sphärendurchmessers erfolgte in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit (in Tagen, D), zum Zelltyp sowie zur Zellzahl. Es wurden sowohl Zellen der Co-Kultur mit Coil- und Dukt-Zellen (a), Zellen des Coils (b) als auch Zellen des Dukts (c) im 3D Modell eingesetzt und bis zu D14 bzw. D21 vermessen ( $n=3\pm\text{SEM}$ ).

### 3.1.3.2 Analyse der Sphären-Struktur mittels histologischer Färbung

Zur Analyse der morphologischen Struktur von 3D Modellen der Schweißdrüse wurden Paraffinschnitte von 3D Co-Kultur Modellen, 3D Coil-Modellen und 3D Dukt-Modellen hergestellt (siehe 2.2.4). Diese wurden anschließend mittels Hämatoxylin Eosin (HE)- und Azan-Färbung gefärbt und lichtmikroskopisch begutachtet (Abb. 12).



**Abbildung 12: Histologische HE- und Azan-Färbung von Paraffinschnitten der 3D Modelle.** Paraffinschnitte von (a) 3D Co-Kultur Modellen, (b) 3D Coil-Modellen und (c) 3D Dukt-Modellen wurden jeweils mithilfe der histologischen HE- und Azan-Färbemethoden gefärbt und im mikroskopischen Bild analysiert. Maßstab entspricht 100 µm.

In der HE-Färbung werden saure bzw. basophile Strukturen, hauptsächlich DNA und Zellkerne, mit dem Farbstoff Hämatoxylin blauviolett sowie basische bzw. acidophile Strukturen, wie Zellplasmaproteine und Kollagenfasern, mit dem Farbstoff Eosin hellrot gefärbt (siehe 2.2.4.3.) (Mulisch & Welsch, 2010). Die HE-gefärbten Schnitte der 3D Modelle zeigten Nuclei blauviolett, wohingegen zelluläre Bestandteile, wie Zytoplasma der epithelialen Zellen, deutlich heller (blasslila bis rot) gegengefärbt wurden. Der HE-gefärbte Paraffinschnitt des 3D Co-Kultur Modells war im gesamten Konstrukt relativ einheitlich lila bis dunkellila gefärbt (Abb. 12a). Das 3D Coil-Modell zeigte allerdings Schichten mit unterschiedlicher Farbtintensität, besonders im Zentrum der Sphäre (Abb. 12b). Das 3D Dukt-Modell wies im Inneren eine Vielzahl von Zellkernen auf und war insgesamt weniger intensiv gefärbt (Abb. 12c). Zur weiteren Differenzierung der Strukturen innerhalb der 3D Modelle wurde die histologische Azan-Übersichtsfärbung durchgeführt.

Mit der Azan-Färbung können Bestandteile von Geweben wie des dermalen Bindegewebes, welches aus Fasern (Kollagen etc.) und nicht-fibrillärer Grundsubstanz besteht, histologisch unterschieden werden. Die Paraffinschnitte der 3D Modelle wiesen dabei je nach Zelltyp unterschiedlich gefärbte Strukturen auf, wobei Epithelzellen rosa gefärbt wurden und in allen 3D Modellen zu finden waren. 3D Coil-Modelle zeigten jedoch rötlicher gefärbtes Gewebe, teilweise rosa gefärbte Zellen sowie im Zentrum der Sphäre sehr stark rot gefärbtes Gewebe. Weiterhin wurden 3D Dukt-Modelle hell rosa gefärbt und zeigten Regionen mit Kollagenfasern, welche blau gefärbt wurden. Des Weiteren besaßen 3D Dukt-Modelle teilweise fädige Strukturen. Außerdem wurden die Sphären aller 3D Modelle von einer Schicht mit intensiver Färbung klar umgrenzt, welche auch deutlich in der HE-Färbung zu erkennen war. Die Ergebnisse der Azan-Färbung wurden in Tabelle 7 zusammengefasst, die sich nach den histologischen Färbungen von Diekmann *et al.* (Diekmann *et al.*, 2016) und Jastrow orientierten (Jastrow, 2014). Anhand der histologischen HE- und Azan-Färbungen konnten unterschiedliche Gewebestrukturen je nach Zelltyp der Schweißdrüse in Schnitten der 3D Modelle (Co-Kultur, Coil, Dukt) dargestellt werden.

**Tabelle 7: Differenzierung von Gewebestrukturen in 3D Modellen der Schweißdrüse mittels histologischer Azan-Färbung.** Nach Jastrow (Jastrow, 2014) und Diekmann *et al.* (Diekmann *et al.*, 2016).

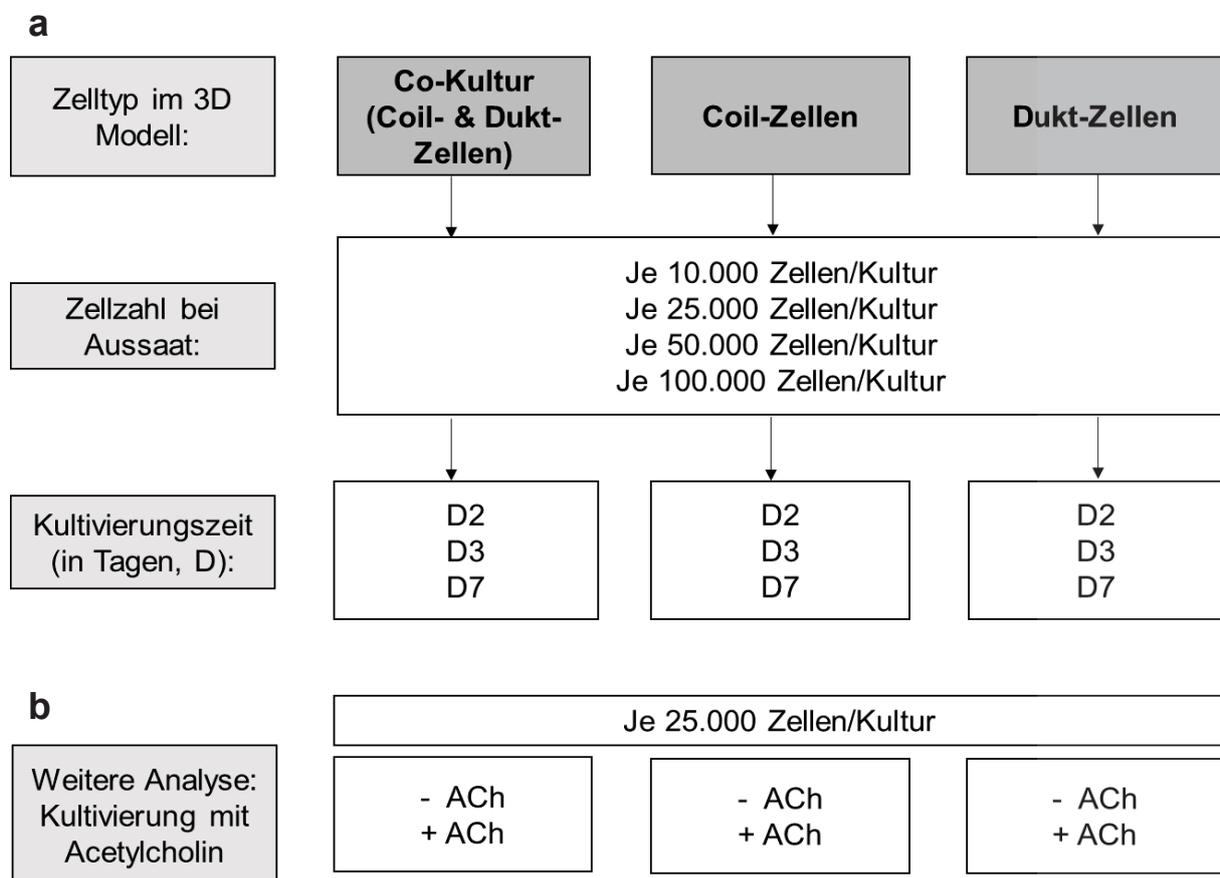
Farbgebung in der Azan-Färbung	Gewebetyp	Lokalisation in 3D Modellen der Schweißdrüse
Blau bis dunkelblau	Kollagene Fasern Typ I, Mucus, Retikuläre Fasern, Basalmembran	3D Dukt-Modell
Hell (blassrot bis orange)	Zytoplasma, Elastische Bindegewebsfasern (Fibrillin und Elastin), Elastische Membranen, Epithelien	Alle 3D Modelle (Co-Kultur, Coil, Dukt)
Rot	Zellkerne, Bindegewebsfasern, weitere Bestandteile der ECM, Erythrozyten	Zentrum des 3D Coil-Modells, teilweise 3D Co-Kultur Modell
Orange bis rot	Muskulatur	Fädige Zellen, äußere Schicht des 3D Modells (v.a. 3D Co-Kultur-Modell)

### 3.1.4 Viabilität von 3D Modellen

Die Viabilität (Lebensfähigkeit einer Zelle) spielt eine entscheidende Rolle bei der *in vitro* Kultivierung, v.a. bei 3D Modellen, die ab einer bestimmten Größe aufgrund ihrer sphäroiden Struktur im Zentrum unterversorgt sein können (Zanoni *et al.*, 2016). Bestimmte Kulturbedingungen oder Behandlungen der Zellkulturen können die Viabilität bzw. die Vitalität der Zellen (Stoffwechselaktivität einer Zelle) negativ beeinflussen, sodass es direkt oder indirekt zu Zytotoxizität, induzierter Apoptose und/oder Nekrose der Zellen kommen kann. Die Zellviabilität in 3D Modellen der Schweißdrüse wurde mittels des „Live-Dead Cell Viability Cytotoxicity Assays“ fluoreszenzmikroskopisch analysiert (siehe 2.2.3.3).

Zur Identifizierung von toten und lebenden Zellen im 3D Konstrukt werden simultan zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Tote Zellen weisen eine defekte löchrige Plasmamembran auf, sodass der rot fluoreszierende Farbstoff Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) dann in die Zelle eindringen kann und mit sehr hoher Affinität in Nukleinsäuren interkaliert. Demgegenüber wird der zellpermeable Farbstoff Calcein-AM intrazellulär von funktional aktiven, ubiquitären Esterasen in vitalen Zellen zu Calcein gespalten und fluoresziert bei Anregung grün. Mit Calcein werden somit lebende und vitale Zellen nachgewiesen. Diese Doppelfärbung erlaubt damit eine Rot-Grün- bzw. Lebend-Tot-Unterscheidung im 3D Modell sowie die Lokalisation dieser Zellen.

Zur Analyse der Viabilität von Schweißdrüsenzellen in 3D Modellen wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Viabilität im Live-Dead Assay untersucht. Dabei wurde die Lebend-Tot-Unterscheidung der Zellen in Abhängigkeit zur Zellzahl, zur Kultivierungsdauer und zum Zelltyp analysiert. Zur Erläuterung des Verfahrens wurde das methodische Vorgehen in einem Schema zusammengefasst (Abb. 13). Die Doppelfärbungen mit Calcein-AM und EthD-1 wurden als *whole mount*-Färbung (Färbung der gesamten Sphäre) durchgeführt. Der Einfluss der Zellzahl, der Kultivierungsdauer und des Zelltyps auf die Viabilität der Schweißdrüsenzellen wurde sowohl in 3D Co-Kultur Modellen als auch in 3D Coil-Modellen und 3D Dukt-Modellen untersucht (Abb. 14-16).

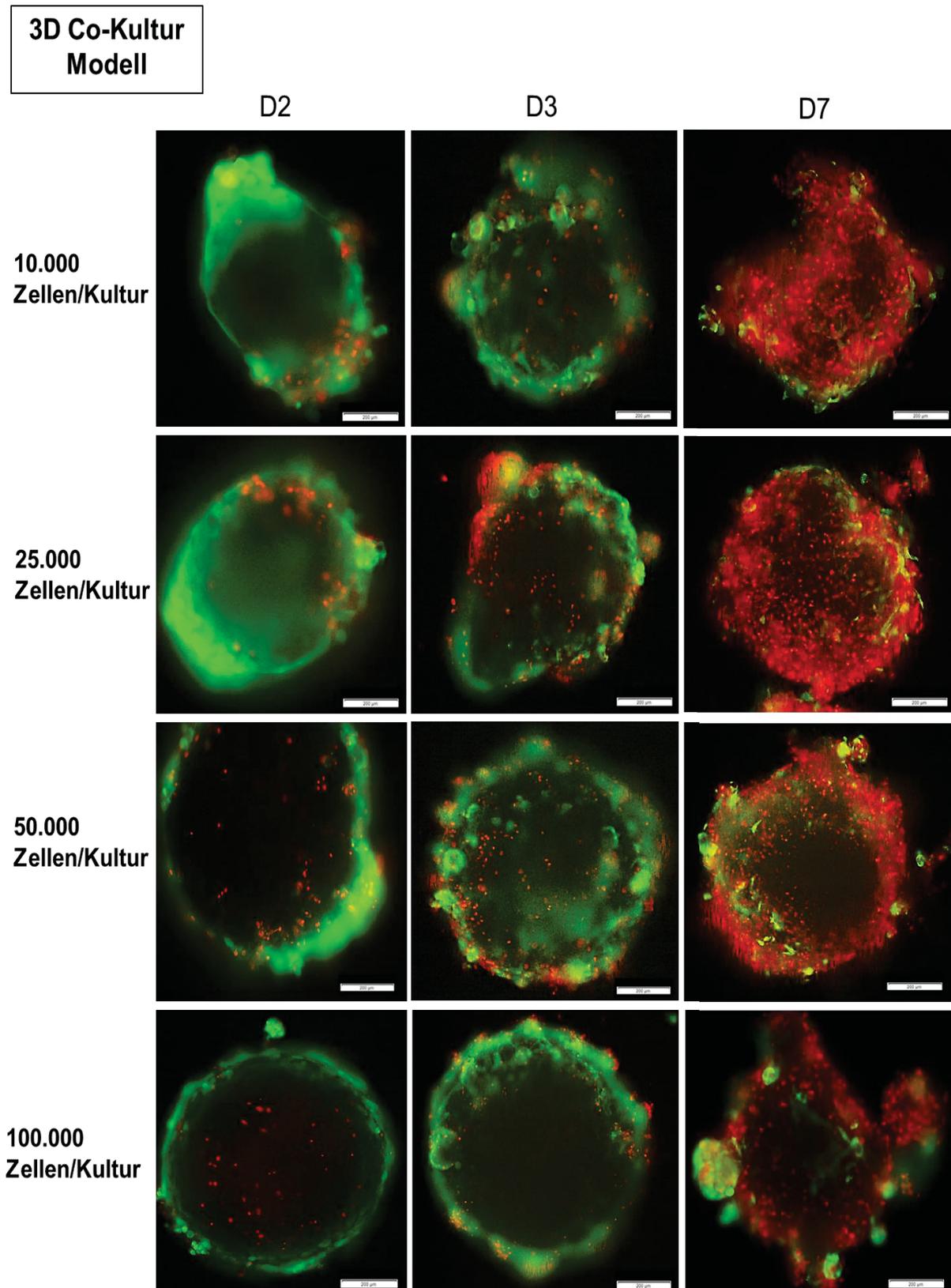


**Abbildung 13: Methodisches Vorgehen zur Analyse der Viabilität von 3D Modellen.** Zur Untersuchung der Viabilität bzw. des Lebend-Tot-Zellanteils wurde ein fluoreszenzbasierter Live-Dead Assay durchgeführt. a) Die Zelltypen der ekkrinen Schweißdrüse (Coil-, Dukt-Zellen) wurden separat oder als Co-Kultur für D2, D3 und D7 mit einer Zellzahl von 10.000-100.000 Zellen/Kultur im 3D Modell kultiviert. Der Viabilitätsnachweis erfolgte dann an den jeweiligen 3D Modellen. b) Des Weiteren wurde der Einfluß von ACh auf die Viabilität analysiert. Dazu wurden die Sphären während der Kultivierungszeit mit dem Neurotransmitter ACh behandelt oder nur in Nährmedium kultiviert (siehe Abb. 26 in Abschnitt 3.3.1).

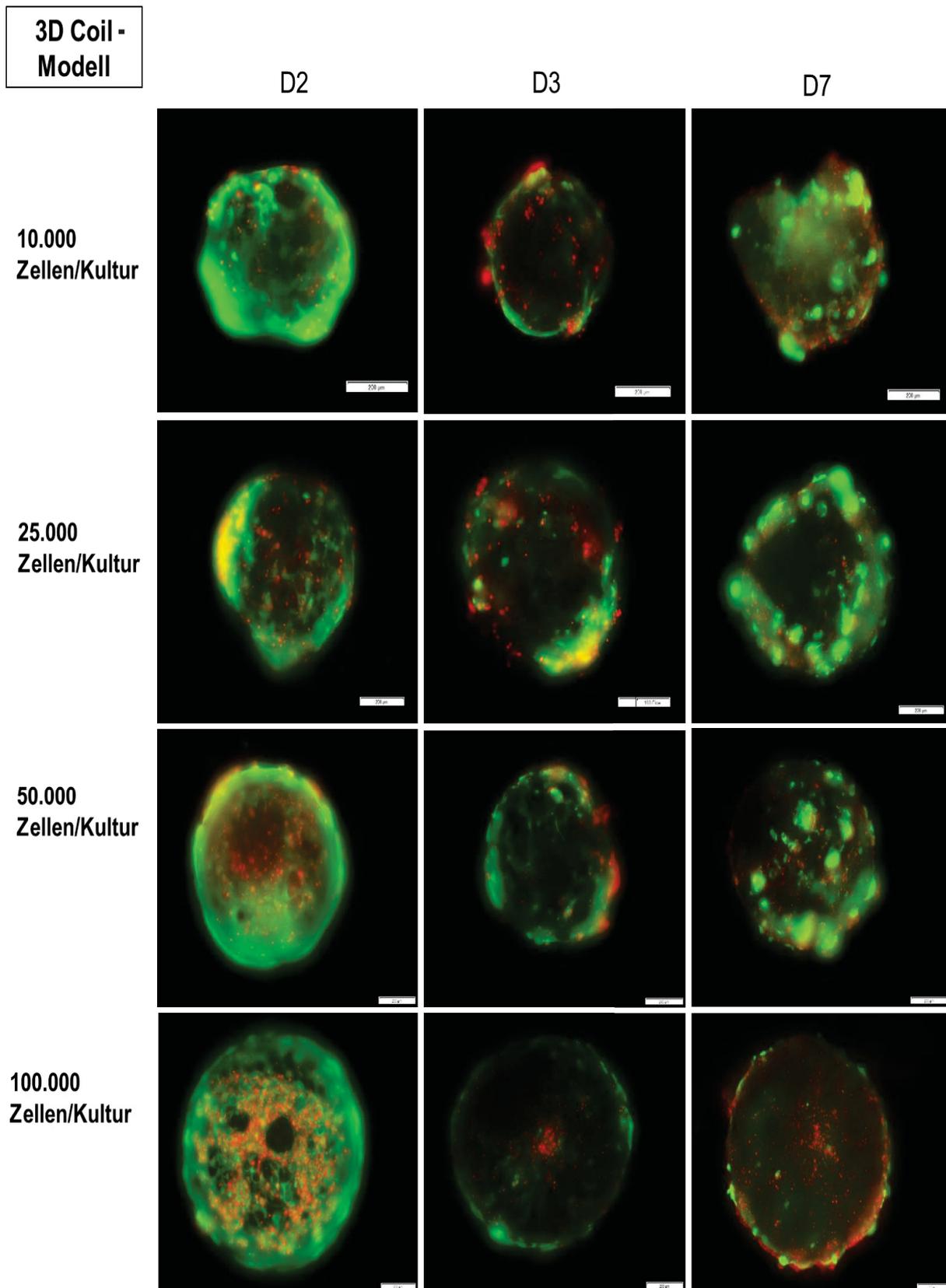
Die Farbstoffe Calcein und EthD-1 zur Lebend-Tot-Unterscheidung der Zellen zeigten in 3D Co-Kultur Modellen – unabhängig von der Zellzahl – eine stark ansteigende Rotfärbung an D7 (Abb. 14). Dies hat die Zunahme von toten Zellen mit verlängerter Kultivierung zu bedeuten. Zwischen D2 und D3 wurde ebenfalls unabhängig von der Zellzahl kein optischer Unterschied in der Viabilität sichtbar. Dabei befanden sich vitale Zellen mit einer intensiven Calcein-Grünfärbung meist an der äußeren Schicht der 3D Modelle, d.h. vermehrt basolateral. Im Inneren der 3D Co-Kultur Modelle konnte häufig keine Rot-Grün-Färbung erzielt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine Kultivierungszeit von D7 aufgrund einer zu hohen Anzahl toter Zellen für die Kultivierung von 3D Co-Kultur Modellen nicht geeignet war. Der Erhalt der Viabilität war nach Aggregation der Zellen dagegen an D2 bzw. D3 für 10.000-100.000 Zellen/Kultur gewährleistet.

Anschließend wurden 3D Modelle aus Coil- bzw. Dukt-Zellen im Viabilitäts-Assay analysiert. Dabei wurde erneut untersucht, ob eine erhöhte Zellzahl (10.000-100.000 Zellen/Kultur) bei Aussaat der 3D Modelle oder die Kultivierungsdauer (D2-D7) die Viabilität negativ beeinflussten und dadurch vermehrt Zelltod im 3D Modell hervorgerufen wurde. Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Viabilität und dem Zelltyp der Schweißdrüse im 3D Modell besteht. Anhand der Fluoreszenz des Calcein-Farbstoffs konnte gezeigt werden, dass 3D Modelle mit getrennt voneinander kultivierten Coil- (Abb. 15) bzw. Dukt-Zellen (Abb. 16) vitalere Zellen im Vergleich zu 3D Co-Kultur Modellen aufwiesen. Wie bei Vermessung des Sphärendurchmessers gezeigt (siehe 3.1.3.1), besitzen 3D Co-Kultur Modelle insgesamt einen erhöhten Sphärendurchmesser (Abb. 11a).

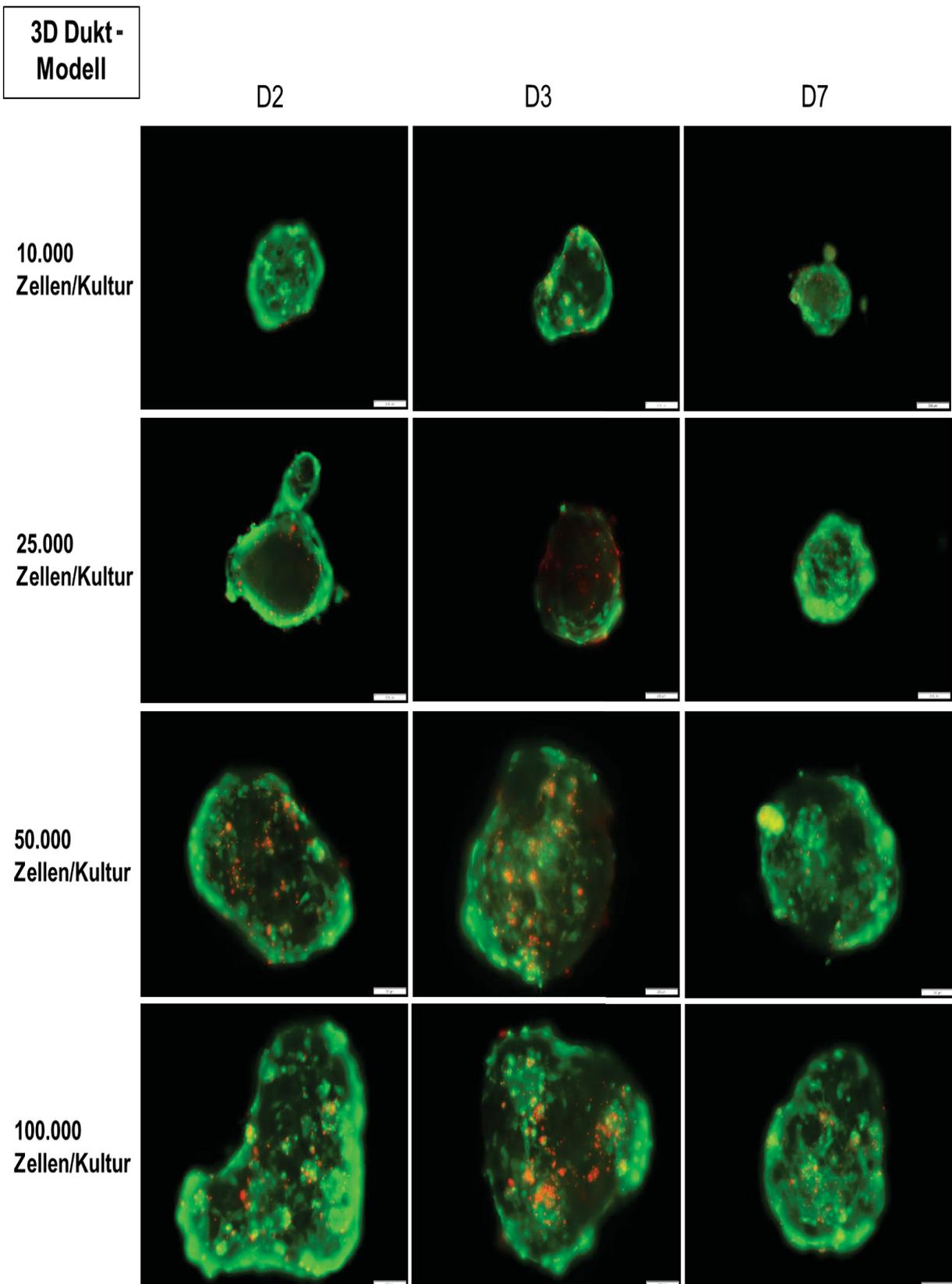
Im 3D Coil-Modell schienen die toten Zellen im gesamten Konstrukt verteilt zu sein (Abb. 15), wie es auch im 3D Co-Kultur Modell nachgewiesen wurde. Weiterhin zeigten 3D Coil-Modelle bei 100.000 Zellen/Kultur eine erhöhte Rotfärbung, welche mit verlängerter Kultivierungszeit der Sphären stark zunahm. Bei 50.000 Zellen/Kultur konnte teilweise ein nekrotisches Zentrum beobachtet werden.



**Abbildung 14: Analyse der Viabilität in 3D Co-Kultur Modellen mittels Live-Dead Assay.** In *whole mount*-Färbungen mit Calcein AM und EthD-1 wurden die 3D Co-Kultur Modelle mit einer Zellzahl von 10.000-100.000 Zellen/Kultur an D2, D3 und D7 auf lebende und tote Zellen untersucht. Bei zunehmender Zellzahl war kein ersichtlicher Unterschied in der Viabilität an D2 bzw. D3 zu erkennen. Der Anteil toter Zellen im 3D Konstrukt nahm allerdings unabhängig von der Zellzahl stark von D3 nach D7 zu. Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 15: Analyse der Viabilität in 3D Coil-Modellen mittels Live-Dead Assay.** Mittels Live-Dead Assay wurden die 3D Coil-Modelle in Abhängigkeit zur Zellzahl und der Kultivierungszeit analysiert. Die 3D Coil-Modelle wurden mit 10.000-100.000 Zellen pro Kultur ausgesät und an D2, D3 und D7 auf ihre Viabilität untersucht. An D7 nahm der Anteil toter Zellen im 3D Konstrukt im Vergleich zu 3D Co-Kultur Modellen nur gering zu. Maßstab entspricht 200 µm.



**Abbildung 16: Analyse der Viabilität in 3D Dukt-Modellen mittels Live-Dead Assay.** Zur Analyse der Viabilität von 3D Dukt-Modellen in Abhängigkeit zur Zellzahl und der Kultivierungsdauer wurde der Live-Dead Assay durchgeführt. Die Kultivierungszeit betrug jeweils D2, D3 und D7. Bei Herstellung der 3D Dukt-Modelle wurden 10.000-100.000 Zellen pro Kultur ausgesät. Die 3D Dukt-Modelle wiesen insgesamt hohe Anteile vitaler Zellen auf. Maßstab entspricht 200 µm.

3D Dukt-Modelle, welche einen deutlich geringeren Durchmesser besitzen, wiesen insgesamt eine sehr schwache Rotfärbung und eine starke Calcein-Grünfärbung auf. Dies deutet auf besonders hohe Vitalität hin (Abb. 16). Auffällig ist, dass besonders bei hohen Zellzahlen (ab 50.000 Zellen/Kultur) z.T. keine sphäroiden, sondern unregelmäßige Sphären aus Dukt-Zellen beobachtet werden konnten. Des Weiteren wurde kein nekrotisches Zentrum in den 3D Dukt-Modellen detektiert.

Zusammengefasst wurde die Viabilität in Abhängigkeit zur Zellzahl (10.000-100.000 Zellen/Kultur) sowie der Kultivierungszeit (D2, D3, D7) an 3D Co-Kultur Modellen, an 3D Coil-Modellen und an 3D Dukt-Modellen analysiert. Außerdem wurden anhand der Doppelfärbung vitale und tote Zellen im 3D Modell lokalisiert, sodass die mikroskopische Analyse auch Aufschluss über die Struktur der Sphären geben konnte. Bei der Lebend-Tot-Unterscheidung wiesen 3D Coil-Modelle sowie 3D Dukt-Modelle insgesamt einen geringeren Anteil toter Zellen auf. Größtenteils konnte dieser Unterschied unabhängig von der Zellzahl und der Kultivierungsdauer gezeigt werden.

## **3.2 Nachweis Schweißdrüsen-spezifischer Marker und Analyse der Differenzierung in 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse**

Anhand der Charakterisierung grundlegender Eigenschaften der ekkrinen Schweißdrüsenzellen konnten verschiedene Parameter in der 2D Kultur und im 3D Modell analysiert und identifiziert werden, die Voraussetzung für die Etablierung eines 3D Modells sind. Die morphologischen Untersuchungen, die histologischen Färbungen, die Analyse der TEER-Eigenschaften sowie die Viabilitäts-Analysen (siehe 3.1) zeigten umfassende charakteristische *in vitro* Eigenschaften der Primärzelltypen der ekkrinen Schweißdrüse in der 2D Kultur sowie im 3D Modell.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Genexpression und die Proteinexpression anhand spezifischer Marker der Schweißdrüse, welche für die Schweißsekretion essentiell sind, sowie die Differenzierung und die Polarität der Zellen im 3D Modell untersucht.

### **3.2.1 Genexpressionsanalysen**

Die Expression spezifischer Gene der Schweißdrüse wurde mithilfe der qRT-PCR untersucht. Dabei wurde die relative Genexpression in nativen isolierten Schweißdrüsen, in 2D Zellkulturen sowie im 3D Modell analysiert. Hier sollten mögliche Genexpressionsänderungen identifiziert und die Zellkultursysteme miteinander verglichen werden. Des Weiteren wurde die Genexpression in den unterschiedlichen 3D Modellen (Co-Kultur, Coil, Dukt) untersucht und mit den entsprechenden 2D Kulturen der Zelltypen verglichen.

Mittels qRT-PCR wurde außerdem die Genexpression in 3D Co-Kultur Modellen in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit analysiert, um eine Aussage über die Genexpression und den Differenzierungszustand der 3D Modelle in Abhängigkeit zur Kultivierungsdauer treffen zu können.

#### **3.2.1.1 Genexpressionsanalyse in 2D Zellkulturen und in 3D Modellen der Schweißdrüse**

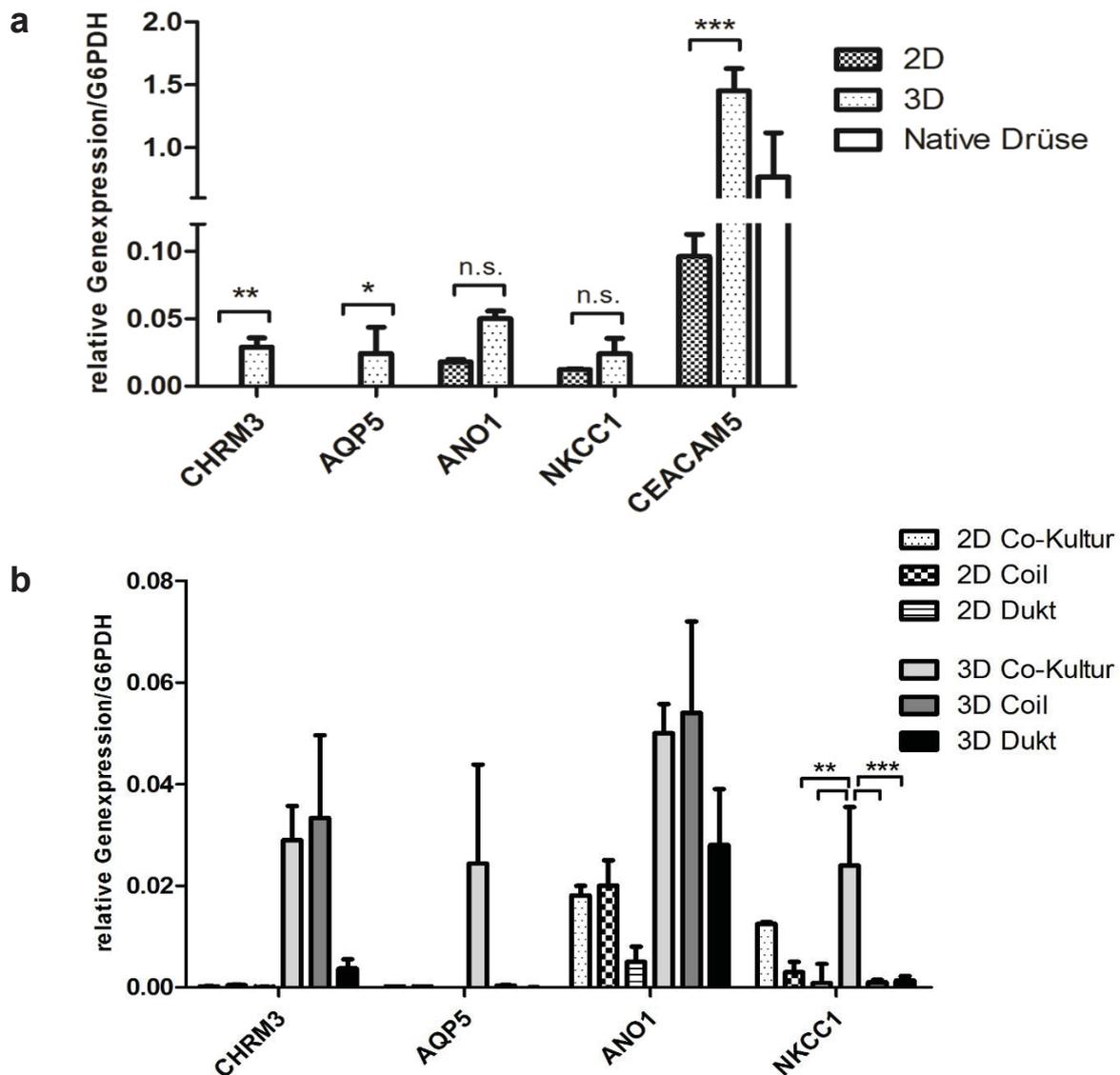
Die Genexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker CEACAM5, CHRM3, AQP5, ANO1, und NKCC1 wurde in nativen Schweißdrüsen, in 2D Kulturen und in 3D Modellen mittels qRT-PCR untersucht. Diese zellspezifischen Marker haben essentielle Funktionen bei der Schweißsekretion. In dieser Analyse sollten

Genexpressionsänderungen in den Zellkultursystemen identifiziert werden. CEACAM5 ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches als Glykoprotein in der Zellmembran verankert ist (Metze *et al.*, 1996). Es dient nicht nur zur Unterscheidung von ekkrinen Schweißdrüsen und fremden Hautgewebe, sondern stellt auch einen spezifischen Differenzierungs- und Polaritätsmarker dar (Ilantzis *et al.*, 2002). CHRM3 empfängt und leitet als muskariner ACh-Rezeptor einen cholinergen Reiz weiter, was zur Aktivierung unterschiedlicher Kanäle sowie Transporter führt und im Endeffekt die Schweißsekretion auslöst. Dazu gehören u.a. der Cotransporter NKCC1, der Chloridkanal ANO1 sowie der Wasserkanal AQP5.

Zunächst wurde die relative Genexpression in nativen Drüsen, in der 2D Co-Kultur sowie im 3D Co-Kultur Modell zum *housekeeping gene* G6PDH analysiert (Abb. 17a). Die zuvor genannten Schweißdrüsen-spezifischen Gene wiesen in 2D Co-Kulturen im Vergleich zum 3D Co-Kultur Modell geringere Expressionslevel auf. Signifikante Genexpressionsunterschiede konnten bei den Markern CHRM3, AQP5 und CEACAM5 in 3D Co-Kultur Modellen detektiert werden. Die 3D Modelle zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression von ANO1 und NKCC1, die statistisch allerdings nicht signifikant war. Weiterhin konnte eine erhöhte CEACAM5-Expression im 3D Modell im Vergleich zur nativen Schweißdrüse gezeigt werden, die somit dem Genexpressionslevel der *in vivo* Situation entspricht.

Zur weiteren Untersuchung wurde die Genexpression in 2D Kulturen und in 3D Modellen der Schweißdrüse analysiert, die mit Zellen des Coils, des Dukts oder als Co-Kultur kultiviert wurden (Abb. 17b). Dabei wurde die Expression der spezifischen Marker im Zusammenhang zwischen dem Zelltyp der Drüse und der Kultivierungsmethode untersucht. In 2D Kulturen konnte der Marker CHRM3 und AQP5 nicht nachgewiesen werden. CHRM3 zeigte die höchste Expression in 3D Coil-Modellen. Eine ähnlich hohe CHRM3-Expression zeigte sich in 3D Co-Kultur Modellen und eine sehr viel geringere Expression in 3D Dukt-Modellen. AQP5 konnte ausschließlich in 3D Co-Kultur Modellen nachgewiesen werden. ANO1 und NKCC1 wurden in 2D Kulturen exprimiert, insgesamt jedoch geringer als in den 3D Modellen. Im 3D Coil Modell und im 3D Co-Kultur Modell war die ANO1-Expression im Vergleich

zu 3D Dukt-Modellen erhöht. NKCC1 wurde in 2D Co-Kultur Modellen verstärkt exprimiert, allerdings in 3D Co-Kultur Modellen statistisch signifikant nachgewiesen.



**Abbildung 17: Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 2D Kulturen und in 3D Modellen.** a) Genexpressionsanalyse von Differenzierungs- (CEACAM5) und Sekretionsmarker (CHRM3, AQP5, ANO1, NKCC1) in 2D Co-Kulturen sowie in 3D Co-Kultur Modellen (D3). Die Expression in nativem Gewebe beispielhaft für CEACAM5 gezeigt ( $n < 8$ , Student's t-Test,  $MW \pm SEM$   $p < 0,05$ (\*)  $< 0,01$ (\*\*)  $< 0,001$ (\*\*\*)). b) Genexpression der Sekretionsmarker in 2D Kulturen und 3D Modellen der Schweißdrüse (Co-Kultur/Coil-Zellen/Dukt-Zellen). *Housekeeping gene* G6PDH mit  $n \geq 10$ ,  $MW \pm SEM$ , One way ANOVA,  $p < 0,05$ (\*)  $< 0,01$ (\*\*)  $< 0,001$ (\*\*\*).

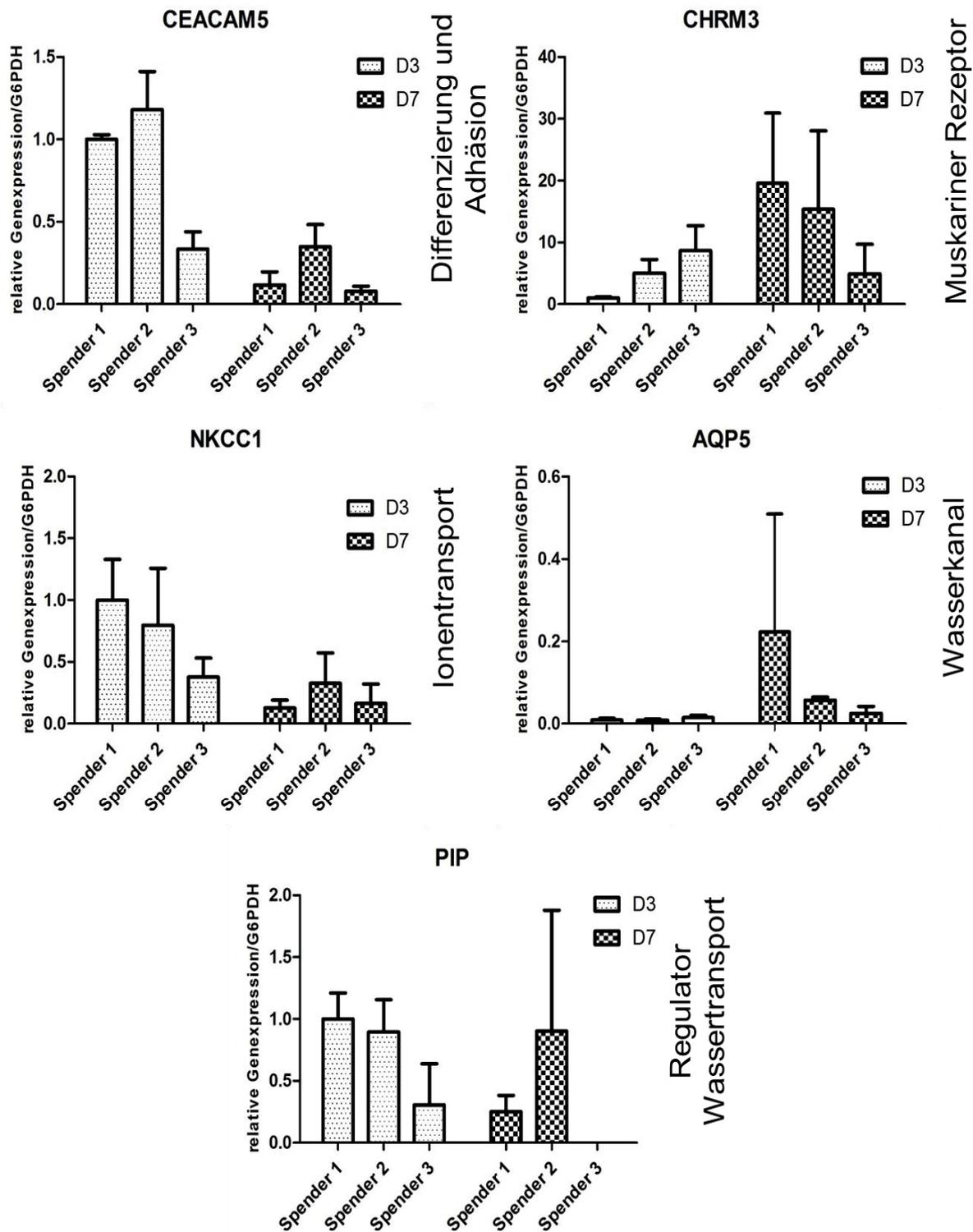
Anhand der Schweißdrüsen-spezifischen Differenzierungs- und Sekretionsmarker CEACAM5, CHRM3, AQP5, ANO1 und NKCC1 erfolgte die *in vitro* Charakterisierung der 2D Kulturen und der 3D Modelle mittels qRT-PCR auf Genexpressionsebene.

Diese Analyse zeigte im Vergleich stark erhöhte Genexpressionslevel im 3D Modell sowie die Änderung der Expression in 3D Coil- bzw. 3D Dukt-Modellen. Das 3D Co-Kultur Modell wies besonders hohe Expressionslevel der einzelnen Marker auf und eignet sich daher für weitere Analysen. Zudem konnten anhand der Genexpressions-Analyse die Vorteile der 3D Kultivierung von ekkrinen Schweißdrüsenzellen als *Hanging drop* im Vergleich zur 2D Kultur dargestellt werden.

### **3.2.1.2 Genexpressionsanalyse in 3D Modellen in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit und Spendervariabilität**

In dieser Studie wurde die Abhängigkeit der Genexpression von der Kultivierungszeit an 3D Co-Kultur Modellen untersucht, die 3 Tage (D3) bzw. 7 Tage (D7) betrug. Zudem wurde die Spendervariabilität in 3D Modellen betrachtet (Abb. 18). Die Genexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Gene, welche die Funktion der Differenzierung (CEACAM5) und der Sekretion (CHRM3, NKCC1, AQP5, PIP) innehaben, wurde in Modellen von 3 unterschiedlichen Spendern analysiert. Das Prolactin-induzierte Protein (PIP) kommt v.a. in Speichel und anderen Körpersekreten wie Schweiß vor und bindet an AQP5, was den Wasserfluss in das Lumen des Coils und somit die Sekretion bewirkt (Nejsun *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 2015). Die Schweißdrüsenzellen stammten aus Gesichtshautbiopsien, deren Alter und Geschlecht bekannt waren. Spender 1-3 waren alle weiblich und im Alter zwischen 43-67 Jahren (J). Die Spendervariabilität der Zellen sowie der Zusammenhang zwischen Kultivierungsdauer und Genexpression konnte somit in 3D Modellen näher untersucht werden.

In Abb. 18 ist die relative Genexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Gene zu G6PDH dargestellt. Insgesamt konnten nur geringe Unterschiede in der Genexpression innerhalb der Spender 1-3 im 3D Co-Kultur Modell festgestellt werden, da keine statistische Signifikanz der Genexpression an D3 bzw. D7 vorlag. Die beiden Spender 1 (43 J) und 2 (67 J) zeigten konstant hohe und ähnliche Genexpressionslevel. Spender 3 (53 J) wies geringere Expressionslevel der hier untersuchten Gene auf. Die Gene CEACAM5, NKCC1 sowie PIP zeigten insgesamt erhöhte Expressionen der Spender an D3, wohingegen CHRM3 und AQP5 an D7 vermehrt exprimiert wurden. Anhand dieser Untersuchung konnte kein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen der Kultivierungsdauer und der Genexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker identifiziert werden.



**Abbildung 18: Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in Abhängigkeit zur Kultivierungsdauer und Spendervariabilität in 3D Modellen.** 3D Co-Kultur Modelle von 3 verschiedenen Spendern aus Gesichtshautbiopsien wurden D3 bzw. D7 kultiviert. Anschließend wurde die relative Genexpression der spezifischen Gene CEACAM5, CHRM3, NKCC1, AQP5 sowie PIP zum *housekeeping gene* G6PDH untersucht. Erhöhte Expressionslevel von CEACAM5, NKCC1 und PIP wurden an D3 detektiert, wohingegen CHRM3 und AQP5 an D7 erhöht exprimiert wurden (Spendervariabilität mit *One way ANOVA* auf statistische Signifikanz geprüft mit  $n=3\pm SEM$ , keine Signifikanzen zwischen Spender 1-3 an D3 bzw. D7).

### 3.2.2 Proteinexpressionsanalysen

Zur Differenzierung der Zelltypen der ekkrinen Schweißdrüse – *clear cells*, *dark cells*, Myoepithelzellen und Dukt-Zellen – wurde die Proteinexpression in den 3D Modellen mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Genexpression einzelner Marker konnte bereits auf mRNA-Ebene gezeigt werden (siehe 3.2.1).

In vorherigen Studien wurden spezifische Marker der ekkrinen Schweißdrüse identifiziert, die eine nähere Unterscheidung der Zelltypen und damit deren Charakterisierung zulassen (Biedermann *et al.*, 2010; Bovell, 2015; Cui & Schlessinger, 2015; Tiede *et al.*, 2009; Zancanaro *et al.*, 1999). Diese sind in Tab. 8 zusammengefasst und zeigen die Expression der Marker im entsprechenden Kompartiment der Schweißdrüse sowie die genaue zelluläre Lokalisation der Marker, falls bekannt. Die Schweißdrüsen-Marker haben wichtige Funktionen inne, wie die Aufrechterhaltung der Zelle (z.B. durch Intermediärfilamente), die Differenzierung und Proliferation, die Signalübertragung und die Schweißsekretion. Jedoch konnte die genaue Lokalisation einiger Marker (z.B. GalR2, GalR3, TRPM8) auf Ebene der einzelnen Zelltypen bzw. einzelner Zellschichten in bisherigen Studien noch nicht eindeutig identifiziert werden.

**Tabelle 8: Identifikation von ekkrinen Schweißdrüsenzellen mithilfe von Schweißdrüsen-spezifischen Markern.** Erkenntnisse aus früheren Studien, modifiziert nach (Biedermann *et al.*, 2010; Bovell, 2015; Cui & Schlessinger, 2015; Zancanaro *et al.*, 1999).

Struktur der Haut	Kompartiment	Zelltyp	Marker	Funktion
Ekkrine Schweißdrüse	Coil + Dukt (Allgemeine Marker der ekkrinen Schweißdrüse)	Coil + Dukt	CEACAM5	Differenzierung und Adhäsion
		Coil + Dukt	CK19	Intermediär-filament
		Coil + Dukt (leicht)	NKCC1	Ionen-transport
		Coil + Dukt	CFTR	Ionen-transport
	Dukt (Spezifische Marker des Dukts)	Luminale + Basale Zellen	CK10	Intermediär-filament
		Keine Lokalisation bekannt	Involucrin	Struktur-funktion
		Keine Lokalisation bekannt	CD200	Transmembran-protein
		Keine Lokalisation bekannt	GalR2	Neuropeptid-Rezeptor
	Coil (Spezifische Marker des Coils)	Myoepithelzellen	alpha-SMA ( $\alpha$ -SMA)	Intermediär-filament
		Myoepithelzellen + <i>Clear cells</i>	CHRM3	Muskariner Rezeptor bei der cholinergen Stimulation
		Myoepithelzellen + <i>Clear cells</i>	S100	Ca <sup>2+</sup> -bindende Proteine
		<i>Clear cells</i> und <i>dark cells</i>	AQP5	Wasserkanal
		<i>Clear cells</i>	Substance P	Neuropeptid
		<i>Dark cells</i>	CGRP	Neuropeptid
		Nicht bekannt	ANO1	Ionen-transport
		Nicht bekannt	CK15	Intermediär-filament
		Nicht bekannt	GalR3	Neuropeptid-Rezeptor
	Keine Lokalisation bekannt	In proliferierenden Zellen nahe des Zellnucleus	Ki67	Proliferations-marker
	Keine Lokalisation bekannt	Keine Lokalisation bekannt	TRPM8	Ionenkanal (Menthol-Rezeptor)
	Stammzell-quelle der Schweißdrüse	Mesenchym + Coil	Stroma + Coil (Myoepithelzellen)	Nestin
Haut	Epidermis	Keratinocyten	Involucrin	Struktur-funktion

### 3.2.2.1 Proteinexpression in 3D Co-Kultur Modellen

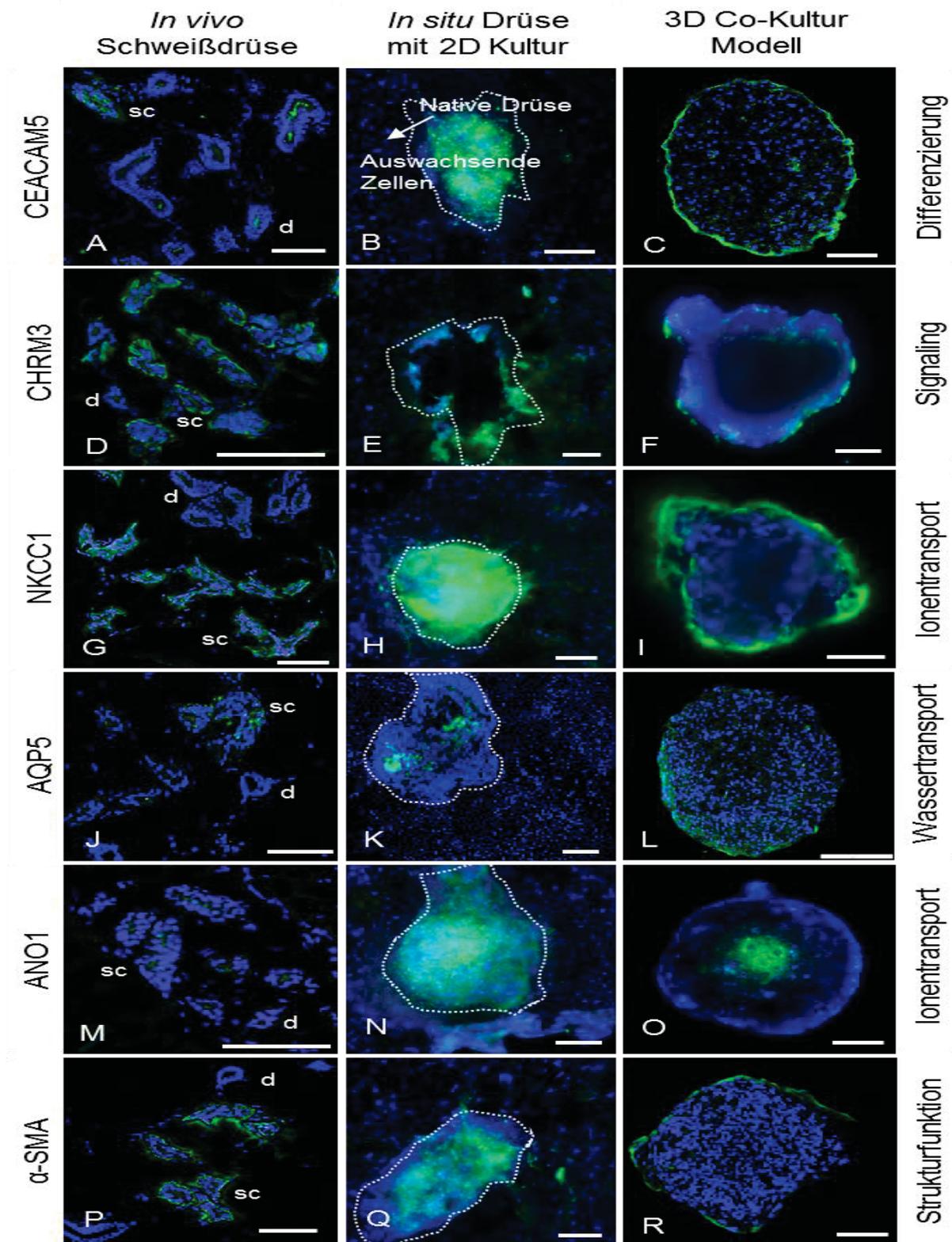
Die Proteinexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker wurde in nativen Drüsen (*in vivo*), in isolierten Drüsen (*in situ*) mit auswachsenden Zellen der 2D Kultur (*in vitro*) sowie in 3D Modellen der Schweißdrüse (*in vitro*) untersucht (Abb. 19+20). Zur Analyse der *in vivo* Situation und als Positiv-Kontrolle dienten humane Hautschnitte. Zur Herstellung der 2D Kulturen wurden isolierte, native Drüsen in Zellkulturgefäße überführt, die adhären. Anschließend kam es zum Auswuchs von Zellen aus dem *in situ* Ursprungsgewebe (siehe 3.1.1). Zur Analyse der Proteinexpression der Marker im 3D Modell wurden histologische Schnitte des 3D Modells hergestellt und auch das Gesamtobjekt (*whole mount*) gefärbt. *Whole mount*-Färbungen eignen sich v.a. um die Orientierung und die intakte Struktur des Modells darstellen zu können.

Auf diese Weise konnte somit die Proteinexpression der Marker in den jeweiligen Zuständen der Schweißdrüsenzellen – *in vivo*, *in situ*, *in vitro* 2D Kultur und *in vitro* 3D Modell – direkt miteinander verglichen werden. Zur Unterscheidung von ekkrinen Schweißdrüsenzellen und Fremdgewebe dienten Immunfluoreszenzfärbungen mit den allgemeinen Markern der Schweißdrüse CEACAM5 und NKCC1 (Abb. 19). Außerdem wurde die Proteinexpression weiterer Schweißdrüsen-spezifischer Marker analysiert, die nur in bestimmten Kompartimenten oder einzelnen Zelltypen der Schweißdrüse vorkommen (Tab. 8).

In nativen Hautschnitten konnte CEACAM5 in sezernierenden und ausführenden Kompartimenten der ekkrinen Schweißdrüse nachgewiesen werden (Abb. 19, A). Die CEACAM5-Proteinexpression konnte auch in *in situ* Drüsen, jedoch nicht in auswachsenden Monolayer-Zellen, identifiziert werden (Abb. 19, B). Im 3D Co-Kultur Modell wurde CEACAM5 v.a. basolateral und schwach luminal exprimiert. Der muskarine Rezeptor CHRM3 ist für die Initiation der cholinergen Signalkaskade verantwortlich und stellt ein G-Protein gekoppeltes Protein mit 7 Transmembrandomänen dar (Forsythe *et al.*, 2002; Kruse *et al.*, 2012). In der Haut wurde CHRM3 in Zellen des sezernierenden Coils, nicht im Dukt, detektiert (Abb. 19, D). Auswachsende Zellen exprimierten kein CHRM3, wohingegen im 3D Modell basolateral CHRM3-Expression vorlag. Der Cotransporter NKCC1 wurde nativ stark basolateral im Coil exprimiert, in 2D Kultur gering vorgefunden und stark basolateral im 3D Modell detektiert. Der Wasserkanal AQP5 wurde nativ nur im sezernierenden

Coil und nicht in 2D Kultur nachgewiesen. Im 3D Modell wurde AQP5 im gesamten Konstrukt detektiert, vermehrt jedoch basolateral. ANO1, ein luminaler  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Chloridkanal, wurde in Hautschnitten luminal im Coil nachgewiesen, erneut nur in der *in situ* Drüse und nicht in auswachsenden Zellen. Das 3D Co-Kultur Modell zeigte ebenfalls eine luminale Expression von ANO1. Dies deutet auf apikal-basale Polarität und auf die Differenzierung der Zellen im 3D Co-Kultur Modell hin und wird in 3.3.4 detailliert behandelt. In Abb. 19, P-R wurde die Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA zum Nachweis von Myoepithelzellen des Coils analysiert.  $\alpha$ -SMA konnte im nativen Hautschnitt nur im äußeren Bereich des Coils detektiert werden. Die Expression von  $\alpha$ -SMA konnte nicht in der 2D Kultur nachgewiesen werden, wohingegen  $\alpha$ -SMA im 3D Co-Kultur Modell basolateral exprimiert wurde.

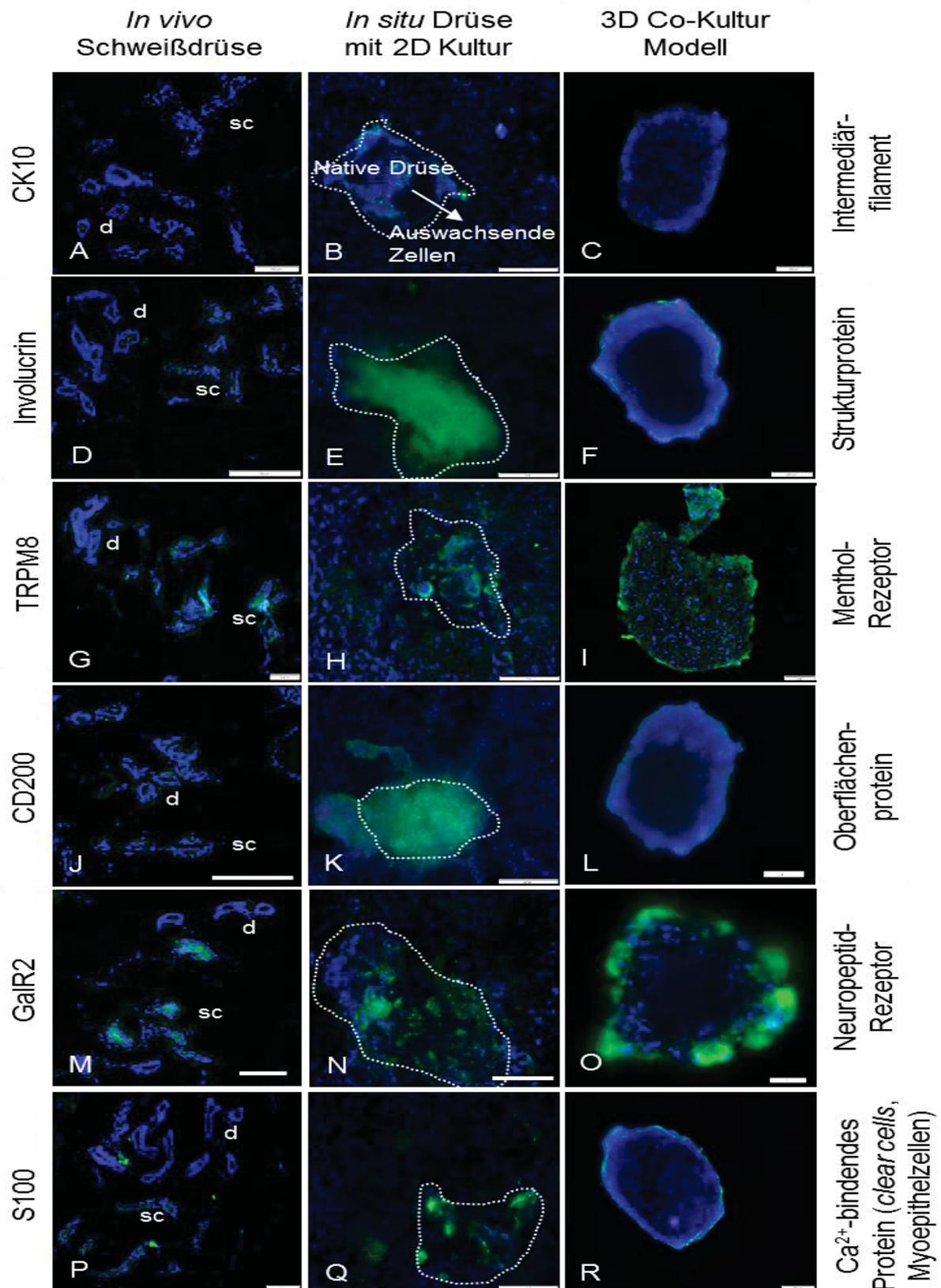
Zusammenfassend konnte mittels der Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden, dass Schweißdrüsenzellen mithilfe der Schweißdrüsen-spezifischen Marker CEACAM5, CHRM3, NKCC1, AQP5, ANO1 und  $\alpha$ -SMA eindeutig identifiziert werden können. Außerdem war eine Differenzierung der Kompartimente möglich. In auswachsenden Zellen der Schweißdrüse wurden diese Marker auf Proteinebene nicht mehr exprimiert. Bei der 3D Kultivierung der Zellen im „hängenden Tropfen“ wurde die Proteinexpression dieser Marker erneut detektiert. Die Vorteile der 3D Kultivierungsmethode auf Ebene der Proteinexpression konnten hier eindeutig demonstriert werden.



**Abbildung 19: Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in nativen Drüsen, in der 2D Kultur und in 3D Co-Kultur Modellen mittels Immunfluoreszenz.** Zur Unterscheidung der Zellen des sezernierenden Coils (sc) und des ausführenden Dukts (d) wurde die Proteinexpression charakteristischer Schweißdrüsen-Marker (CEACAM5, CHRM3, NKCC1, AQP5, ANO1,  $\alpha$ -SMA) an Hautschnitten, an adhärenenten *in situ* Drüsen und deren auswachsenden Monolayerzellen der 2D Kultur sowie am 3D Co-Kultur Modell mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zellkerne mit DAPI (blau) und Zielprotein (grün) markiert. Maßstab entspricht 100  $\mu$ m.

Des Weiteren wurden Marker untersucht, die seltener Gegenstand der Forschung sind und deren Lokalisation in der Schweißdrüse daher noch nicht genauer identifiziert wurde. Dazu gehören Zytokeratin 10 (CK10), Involucrin, *transient receptor potential cation channel member 8* (TRPM8), *cluster of differentiation 200* (CD200), Galanin Rezeptor 2 (GalR2) und S100 als Ca<sup>2+</sup>-bindendes Protein. Es ist bekannt, dass diese Marker spezifisch in der ekkrinen Schweißdrüse exprimiert werden (Biedermann *et al.*, 2010; Czifra *et al.*, 2012; Zancanaro *et al.*, 1999), jedoch größtenteils nicht welcher Subzelltyp diese Marker exprimiert. Die Analyse der Proteinexpression dieser Marker und deren Lokalisation konnte bisher auch noch nicht in 3D Modellen der Schweißdrüse gezeigt werden.

Im *in vivo* Zustand der Schweißdrüse konnte CK10 nur schwach luminal im Dukt nachgewiesen werden (Abb. 20, A), was den aktuellen Erkenntnissen entspricht (Biedermann *et al.*, 2010). Die *in situ* Drüse zeigte eine leichte CK10-Expression, jedoch konnte CK10 weder in auswachsenden Zellen (Abb. 20, B) noch im 3D Co-Kultur Modell (Abb. 20, C) detektiert werden. Involucrin stellt einen nicht-spezifischen Schweißdrüsen-Marker des Duktus dar, da dieser auch suprabasale Keratinozyten der Epidermis markiert (Tharakan *et al.*, 2010). Im Hautschnitt wurden der luminale Dukt und auch das sezernierende Coil leicht gefärbt, sodass an dieser Stelle keine genaue Unterscheidung der beiden Kompartimente möglich war (Abb. 20, D). Migrierende Zellen zeigten keine Involucrin-Expression mehr (Abb. 20, E), wohingegen die *in situ* Drüse den Marker Involucrin stark exprimiert. Involucrin wurde im 3D Modell gering in proliferierenden Zellen der äußeren Zellschicht gezeigt (Abb. 20, F). TRPM8 wurde nativ stark im Coil und auch in der *in situ* Drüse nachgewiesen, jedoch gering in der 2D Kultur. Im gesamten 3D Co-Kultur Modell wurde TRPM8 stark exprimiert (Abb. 20, G-I). Das Oberflächenprotein CD200, das nur im Dukt nachgewiesen wurde (Biedermann *et al.*, 2010), konnte nur gering basolateral in nativen Hautschnitten gezeigt werden. *In situ* wurde eine diffuse Expression der gesamten adhärennten Drüse mit geringer Expression sowohl in der 2D Kultur als auch im 3D Co-Kultur Modell festgestellt (Abb. 20, J-L).



**Abbildung 20: Proteinexpression weiterer Schweißdrüsen-spezifischer Marker in nativen Drüsen, in der 2D Kultur und in 3D Co-Kultur Modellen mittels Immunfluoreszenz.** Nachweis der Marker (CK10, Involucrin, TRPM8, CD200, GalR2, S100) in nativen Hautschnitten, in *in situ* Drüsen, in der 2D Kultur sowie im 3D Co-Kultur Modell mittels Immunfluoreszenz. Zellkerne mit DAPI (blau) und Zielprotein (grün) markiert. Maßstab in Hautschnitten 100 µm, 2D Kultur und 3D Modell 200 µm; sc=sezernierendes Coil, d=Dukt.

GalR2 zeigte in den Kompartimenten der nativen Drüse eine differenzierte Expression, da dieses Neuropeptid stark im Coil und nicht im Dukt detektiert wurde (Abb. 20, M). In der *in situ* Drüse und in der 2D Kultur wurde GalR2 geringer exprimiert, konnte jedoch im 3D Co-Kultur Modell wieder nachgewiesen werden (Abb. 20, N+O). S100 wurde nativ gering im Coil exprimiert und zeigte z.T. starke punktuelle Fluoreszenz, jedoch keine Expression im Dukt (Abb. 20, P). In der *in situ* Drüse wurde eine S100-Expression, die auf wesentliche Bereiche begrenzt war, festgestellt und auch vereinzelt in auswachsenden Zellen der 2D Kultur exprimiert wurde (Abb. 20, Q). Im 3D Co-Kultur Modell konnte die S100-Expression erneut nur in der äußeren Zellschicht schwach nachgewiesen werden.

In Abb. 20 konnte die Proteinexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker CK10, Involucrin, TRPM8, CD200, GalR2, und S100 gezeigt werden. Zur eindeutigen Unterscheidung von Coil und Dukt können somit die Marker GalR2 für die Identifikation des Coils und Involucrin, CK10 oder CD200 für die Identifikation des Duktes verwendet werden. Jedoch wiesen CK10, CD200 und Involucrin nativ und im 3D Co-Kultur Modell sehr geringe Expressionen auf und eignen sich nur mäßig für die Identifikation von Dukt-Zellen. Tabelle 9 dient der Zusammenfassung der in Abb. 19+20 ersichtlichen Beobachtungen.

**Tabelle 9: Übersicht der Proteinexpressionen nach Immunfluoreszenzfärbung der nativen Schweißdrüse und im 3D Co-Kultur Modell. + positiv, – negativ, +/- nicht eindeutig**

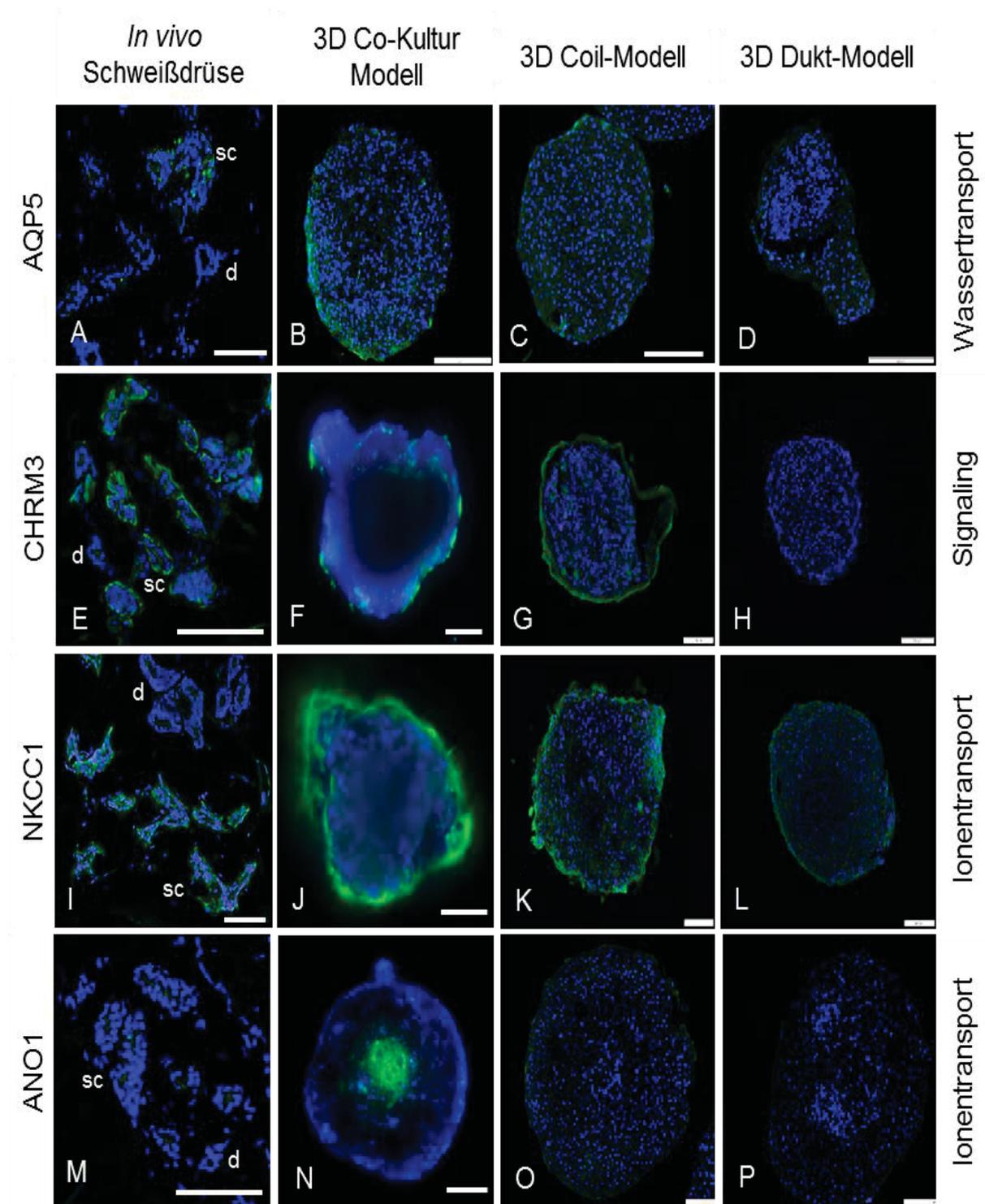
Marker	Nativer Coil	Nativer Dukt	3D Co-Kultur Modell
CEACAM5	+	+	+
CHRM3	+	–	+
NKCC1	+	+/-	+
AQP5	+	–	+
ANO1	+/-	–	+
$\alpha$ -SMA	+	–	+
CK10	–	+/-	+/-
Involucrin	–	+/-	+/-
TRPM8	+	+/-	+
CD200	–	+/-	+/-
GalR2	+	–	+
S100	+/-	–	+/-

Insgesamt wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker am 3D Co-Kultur Modell im Vergleich zur nativen Drüse und zur *in situ* Drüse mit auswachsenden Zellen der 2D Kultur analysiert (Abb. 19+20). Zum Nachweis von Coil-Zellen konnte eine Vielzahl von spezifischen Markern im 3D Modell identifiziert werden. Für die Identifikation von Dukt-Zellen wurden Involucrin, CD200 und CK10 eingesetzt, die in der Literatur als spezifische Dukt-Marker betrachtet werden (Biedermann *et al.*, 2010; Cui & Schlessinger, 2015). Außerdem konnte der Verlust der Proteinexpression dieser Marker gezeigt werden, sobald Zellen aus der *in situ* Drüse migrierten und in die 2D Kultur übergingen. Die Proteinexpression wurde in 3D Co-Kultur Modellen erneut festgestellt.

### 3.2.2.2 Proteinexpression in 3D Coil-Modellen und in 3D Dukt-Modellen

In einer weiteren Analyse wurden ausgewählte Marker aus Tab. 8 an 3D Coil-Modellen und 3D Dukt-Modellen, die nur mit Coil-Zellen bzw. mit Dukt-Zellen kultiviert wurden, analysiert. Die Proteinexpression konnte anschließend mit dem 3D Co-Kultur Modell verglichen werden (siehe 3.2.2.2). Zunächst wurden die Marker AQP5, CHRM3, NKCC1 und ANO1 untersucht (Abb. 21). Diese eignen sich besonders zur grundlegenden Charakterisierung, da die genaue Lokalisation dieser Marker bereits weitestgehend beschrieben wurde (Cui & Schlessinger, 2015).

In der nativen Drüse (Abb. 21, A) wurde der Wasserkanal AQP5 *in vivo* nur im Coil exprimiert. Im 3D Coil-Modell wurde AQP5 ähnlich stark exprimiert (Abb. 21, C), wohingegen im 3D Dukt-Modell keine AQP5-Expression gezeigt werden konnte (Abb. 21, D). CHRM3 wurde basolateral im 3D Coil-Modell exprimiert (Abb. 21, G), was der CHRM3-Expression *in vivo* und auch im 3D Co-Kultur Modell entsprach (Abb. 21, E+F). Es konnte keine CHRM3-Expression im 3D Dukt-Modell detektiert werden (Abb. 21, H). NKCC1 als Ionen-Cotransporter wurde im 3D Co-Kultur Modell (Abb. 21, J) und im 3D Coil-Modell stark im gesamten Sphäroid detektiert (Abb. 21, K), geringer im 3D Dukt-Modell (Abb. 21, L). Die Expression von ANO1 konnte weder in 3D Coil-Modellen noch in 3D Dukt-Modellen nachgewiesen werden (Abb. 21, O+P), jedoch stark luminal im 3D Co-Kultur Modell (Abb. 21, N). *In vivo* wurde ANO1 stark luminal im Coil exprimiert, nicht aber im Dukt (Abb. 21, M).



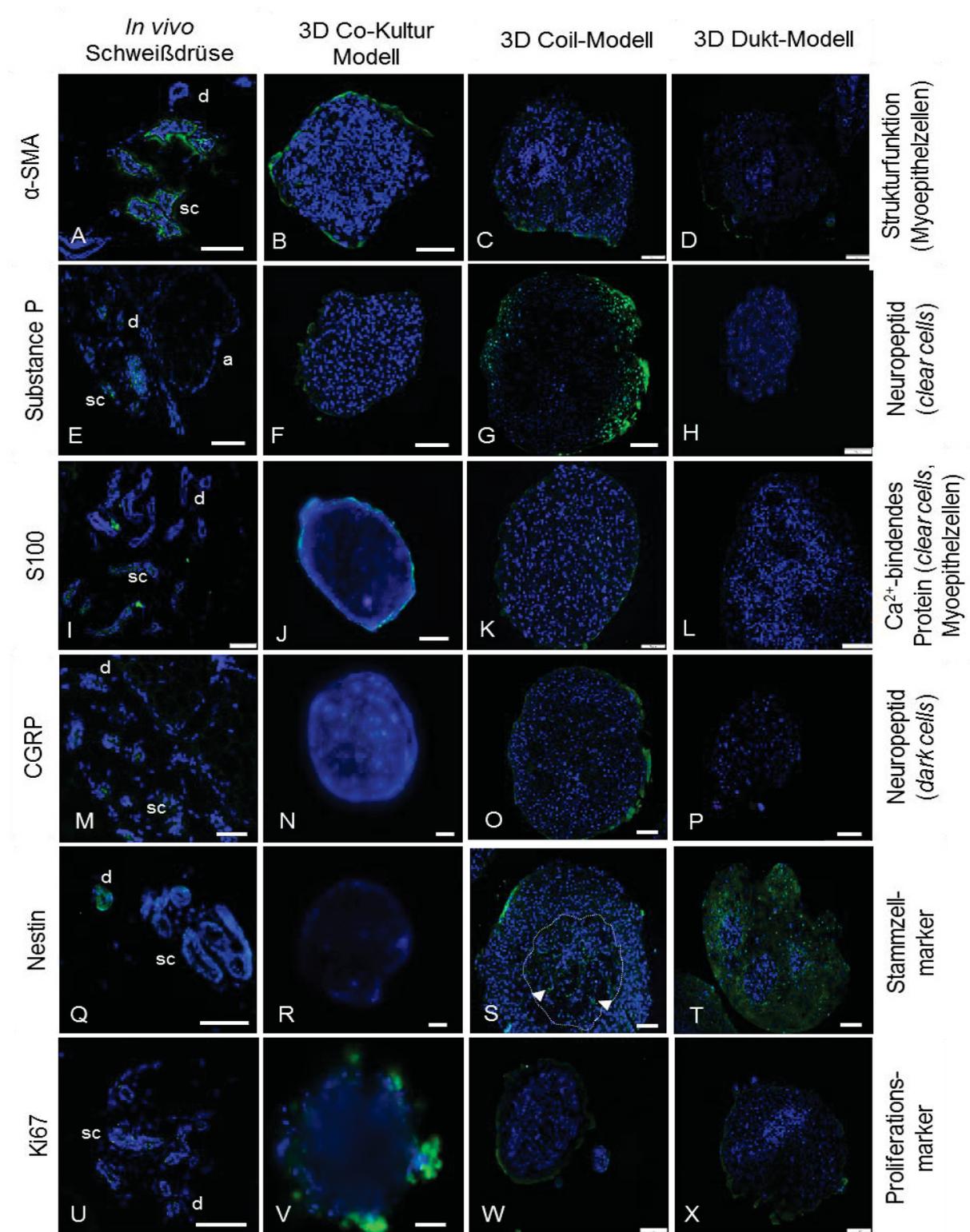
**Abbildung 21: Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Co-Kultur Modellen, in 3D Coil-Modellen und in 3D Dukt-Modellen mittels Immunfluoreszenz.** Vergleich der Proteinexpression und des Differenzierungszustands der Zellen in 3D Co-Kultur Modellen, 3D Coil-Modellen und 3D Dukt-Modellen aus primären Zellen mittels Immunfluoreszenz. AQP5, CHRM3, NKCC1 und ANO1 dienen dem Nachweis spezifischer Proteine in den 3D Modellen, die in 2D Kultur nicht nachgewiesen werden konnten. Zellkerne mit DAPI (blau) und Zielprotein (grün) markiert. Maßstab entspricht 100 µm, sc=sezernierendes Coil, d=Dukt.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Zelltypen der Schweißdrüse – *clear cells*, *dark cells*, Myoepithelzellen und Stammzellen – mittels spezifischer Marker in der Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (Abb. 22).

Zum Nachweis von Myoepithelzellen wurde  $\alpha$ -SMA eingesetzt, ein spezifischer Marker dieses Zelltyps des Coils (Abb. 22, A-D) (Kurata *et al.*, 2014; Schon *et al.*, 1999). Im 3D Co-Kultur Modell wurde  $\alpha$ -SMA im Randbereich des Sphäroids exprimiert, im 3D Coil-Modell konnte nur geringe Expression und im 3D Dukt-Modell keine Expression detektiert werden.

Substance P und S100 stellen Marker der *clear cells* im sezernierenden Coil dar, (Zancanaro *et al.*, 1999), allerdings wird S100 teilweise auch als Myoepithelzellen-Marker verwendet (Wilke *et al.*, 2006). Im 3D Coil-Modell wurde im äußeren Bereich des Modells eine starke Substance P-Expression nachgewiesen (Abb. 22, E-H). S100 wurde gering im Randbereich des 3D Co-Kultur Modells und des 3D Coil-Modell exprimiert (Abb. 20, I+K). *In vivo* wurden Substance P und S100 nicht im Dukt (Abb. 22, E+I) und auch nicht im 3D Dukt-Modell exprimiert (Abb. 22, H+L). *Dark cells* exprimieren CGRP (Bovell, 2015; Zancanaro *et al.*, 1999), was zur Identifikation dieses Zelltyps genutzt wurde. CGRP konnte im 3D Co-Kultur Modell und im 3D Coil-Modell nachgewiesen werden (Abb. 22, N+O). Zur Differenzierung von *clear cells* und *dark cells* wurden weitere Studien durchgeführt (siehe 3.2.2.3).

Nestin wurde als Stammzellmarker in ekkrinen Schweißdrüsen beschrieben und dient der Identifizierung von Stammzellpopulationen (Nagel *et al.*, 2013; Petschnik *et al.*, 2010; Tiede *et al.*, 2009). In nativen Drüsen wurde Nestin stark im Dukt und gering im Coil exprimiert, jedoch nicht im 3D Co-Kultur Modell (Abb. 20, Q+R). Im 3D Coil-Modell wurden Nestin-positive Zellen vorwiegend luminal und im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen (Abb. 20, S). In 3D Dukt-Modellen konnte Nestin im gesamten Modell detektiert werden und wurde hauptsächlich nahe des Nucleus exprimiert (Abb. 20, T). Der Proliferationsmarker Ki67, der sich teilende Epithelzellen markiert (Cantaloube *et al.*, 2004), konnte im Randbereich des 3D Co-Kultur Modells, nicht aber im 3D Coil- bzw. 3D Dukt-Modell gezeigt werden (Abb. 22, U-X).



**Abbildung 22: Identifikation von Subzelltypen anhand spezifischer Marker in 3D Modellen mittels Immunfluoreszenz.** Proteinexpressionsnachweis mittels Immunfluoreszenz von  $\alpha$ -SMA, Substance P, S100, CGRP und Nestin in 3D Co-Kultur Modellen, 3D Coil Modellen und 3D Dukt Modellen verglichen mit der nativen Drüse mit sezernierendem Coil (sc), Dukt (d) und apokriner Drüse (a) in E.  $\alpha$ -SMA wurde in Myoepithelzellen, Substance P und S100 in *clear cells*, CGRP in *dark cells* exprimiert. Nestin konnte in 3D Coil-Modellen (Pfeilköpfe) und in 3D Dukt-Modellen nachgewiesen werden. Ki67 detektierte proliferierenden Zellen. Zellkerne mit DAPI (blau) und Zielprotein (grün) markiert. Maßstab entspricht 100  $\mu$ m.

Die Marker  $\alpha$ -SMA, Substance P, S100, CGRP, Nestin und Ki67 wurden zur Identifikation von *clear cells*, *dark cells*, Myoepithelzellen, Stammzellen und proliferierenden Zellen in 3D Modellen der Schweißdrüse verwendet und weisen auf den Differenzierungszustand der Zellen im 3D Modell hin. Zur Übersicht der durchgeführten Fluoreszenzfärbungen wurden die Ergebnisse aus Abb. 21+22 in Tab. 10 zusammengefasst und anhand der Intensität der Färbung bewertet.

**Tabelle 10: Übersicht der Proteinexpressionen nach Immunfluoreszenzfärbung von 3D Modellen.** + positiv, – negativ, +/- nicht eindeutig

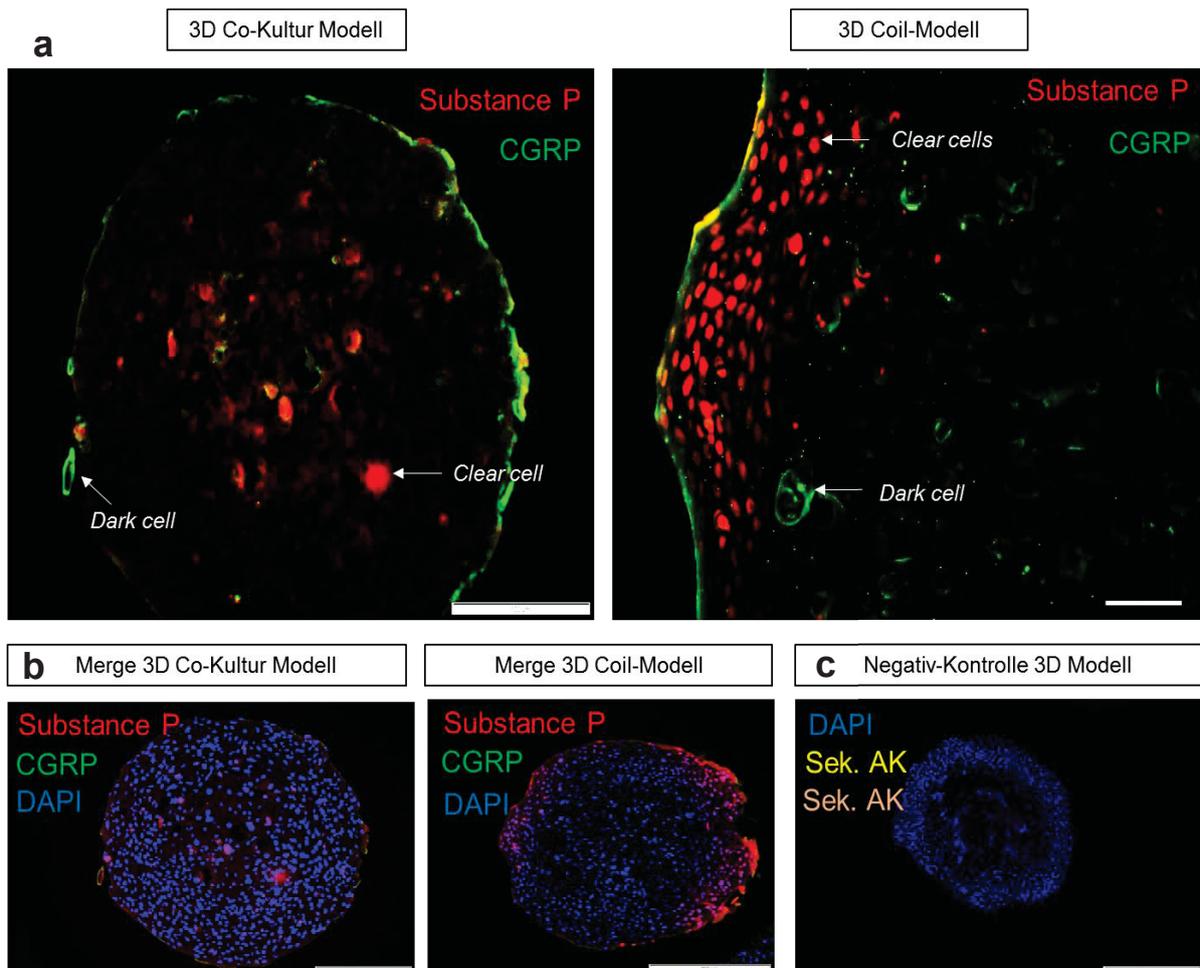
Marker	Native Drüse:		3D Co-Kultur Modell	3D Coil-Modell	3D Dukt-Modell
	Coil	Dukt			
AQP5	+	–	+	+	–
CHRM3	+	–	+	+	–
NKCC1	+	+/-	+	+	+/-
ANO1	+/-	–	+	–	–
$\alpha$ -SMA	+	–	+	+/-	–
Substance P	+	–	+/-	+	–
S100	+/-	–	+/-	+/-	–
CGRP	+	–	+/-	+	–
Nestin	+/-	+	–	+	+
Ki67	+/-	–	+	–	–

Die Charakterisierung der 3D Modelle mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde sowohl an Schnitten als auch an *whole mount*-Sphären erfolgreich etabliert. Zur Identifikation der Zelltypen und zur Analyse des Differenzierungszustands der Zellen in den 3D Modellen der Schweißdrüse wurden spezifische Marker eingesetzt. Dazu gehören  $\alpha$ -SMA, der Stammzellmarker Nestin und v.a. Neuropeptide wie Substance P und CGRP, die von Zellen des Coils sekretiert werden.

### 3.2.2.3 Co-Lokalisation von *clear cells* und *dark cells* in 3D Modellen

Zur Identifikation von *clear cells* und *dark cells* des sezernierenden Coils wurde die Immunreaktivität von Substance P und CGRP in 3D Modellen der Schweißdrüse mittels Immunfluoreszenz analysiert. Substance P und CGRP stellen sog. Neuropeptide dar und können die Schweißsekretion beeinflussen (Bovell *et al.*, 2013; Levy *et al.*, 1992; Vilches *et al.*, 2012). Morphologisch und funktionell lassen sich diese

sezernierenden Zellen des Coils voneinander unterscheiden und werden von Myoepithelzellen und einer Basalmembran umgeben, die das Coil bilden (Abb. 2). „Dunkle“ sezernierende Zellen enthalten eine hohe Anzahl an Ribosomen und Sekretgranula. „Helle“ sezernierende Zellen besitzen wenig Ribosomen und sind für die wässrige Sekretion verantwortlich (Benninghoff, 1985).



**Abbildung 23: Co-Lokalisation von *clear cells* und *dark cells* in 3D Modellen mittels Immunfluoreszenz.** Proteinexpressionsnachweis von Substance P und CGRP zur Unterscheidung von *clear cells* und *dark cells* in 3D Co-Kultur Modellen und 3D Coil Modellen aus humanen Primärzellen. a) Expression von Substance P (rot) und CGRP (grün) zur Markierung von *clear cells* und *dark cells*. b) *Merge* (Überlagerung) der Fluoreszenzkanäle (rot und grün) und Markierung der Zellkerne mit DAPI (blau). c) Negativ-Kontrolle ohne Zugabe des Primärantikörpers. Maßstab entspricht in a) 100 µm, in b+c) 200 µm.

Zur Untersuchung des Vorkommens sowie der Verteilung der sezernierenden *clear cells* und *dark cells* in 3D Modellen der Schweißdrüse wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Marker Substance P (*clear cell*-spezifisch) und CGRP

(*dark cell*-spezifisch) wurden simultan als Co-Lokalisation in Schnitten der 3D Modelle nachgewiesen (Abb. 23).

In 3D Co-Kultur Modellen konnten sowohl luminal *clear cells* mittels Substance P als auch basolateral *dark cells* mithilfe von CGRP gezeigt werden (Abb. 23, A). In dieser Modellart zeigten vereinzelte Zellen schwache unspezifische Bindungen beider Marker.

3D Coil-Modelle wiesen in hoher Anzahl Substance P-positive Zellen auf. Dieses Protein wurde in Nähe der Nuclei bzw. im Zytoplasma exprimiert. Aufgrund dessen wurde die DAPI-Zellkernmarkierung in Abb. 23, A nicht dargestellt. Die CGRP-positiven Zellen befanden sich im 3D Coil-Modell z.T. luminal sowie in der äußeren Zellschicht der Sphäre. Im Gegensatz zur Lokalisation von Substance P, welches im Zytoplasma sowie beim Nucleus exprimiert wurde, wurde CGRP stark in der Membran der positiven Zellen detektiert. In Abb. 23, B+C wurden die rot-grünen Fluoreszenzkanäle und die Markierung der Zellkerne mit DAPI als *Merge* überlagert. Um auszuschließen, dass es sich um unspezifische Bindung der CGRP- und Substance P-Primärantikörper handelt, wurden in der Negativ-Kontrolle nur die korrespondierenden Sekundärantikörper eingesetzt und damit die spezifischen Bindungen der Primär-Antikörper gezeigt (Abb. 23, C).

Diese Doppelfärbung verdeutlichte somit die Differenzierung und den Erhalt (Homöostase) der *clear* und *dark cell*-Zelltypen der Schweißdrüse sowohl im 3D Co-Kultur Modell als auch im 3D Coil-Modell.

### **3.2.3 Optimierung der Zelltyp-Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie**

Die *in vitro* kultivierten Primärzellen wurden in dieser Studie mithilfe indirekter Immunfluoreszenzfärbung in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Expression von Schweißdrüsen-spezifischen Markern in 3D Modellen wurde zwar bereits auf Ebene der Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (siehe 3.2.2). Die Durchflusszytometrie ermöglicht es jedoch, den prozentualen Anteil der Zellpopulationen quantitativ zu bestimmen. Es wurden erneut die Oberflächenproteine sowie die intrazellulären Proteine (siehe Tab. 8), wie z.B. das Strukturprotein  $\alpha$ -SMA, zur Identifikation der Zelltypen in einer Einzelzellsuspension der 2D Kultur eingesetzt. Die Zellen der 2D Kultur wurden im Anschluss in ein 3D Modell überführt. In Abb. 24

sind exemplarisch Expressionsprofile der 2D Co-Kultur und der 2D Coil-Kultur sowie eine detaillierte Auswertung der Analysen im Diagramm dargestellt (Abb. 24, C).

Mittels Durchflusszytometrie konnte eine große Anzahl charakteristischer Marker in Zellpopulationen der Schweißdrüse quantitativ bestimmt und somit deren Proteinexpression in der 2D Co-Kultur und der 2D Coil-Kultur analysiert werden. Die Histogramme in Abb. 24, A+B zeigen die Intensität der Fluoreszenzsignale der positiv-markierten Zellen als *Peak*. Die Normierung der Fluoreszenzintensität der Probe erfolgte durch die Subtraktion der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle, sodass hier nur das spezifische Signal berücksichtigt wurde.

In beiden Kulturen wurde CEACAM5 zu hohen Anteilen exprimiert, in der 2D Co-Kultur jedoch fast zu 90 %. Dieser Marker wird *in vivo* sowohl im sezernierenden Coil als auch im resorbierenden Dukt exprimiert. Auffällig ist, dass das CEACAM5-Histogramm zwei Peaks in der 2D Coil-Kultur aufweist (Abb. 22, b). Substance P stellt einen *clear cell*-Marker dar und wurde ebenfalls stark in beiden Zellpopulationen exprimiert. CD200 als Dukt-Marker konnte nur gering nachgewiesen werden.

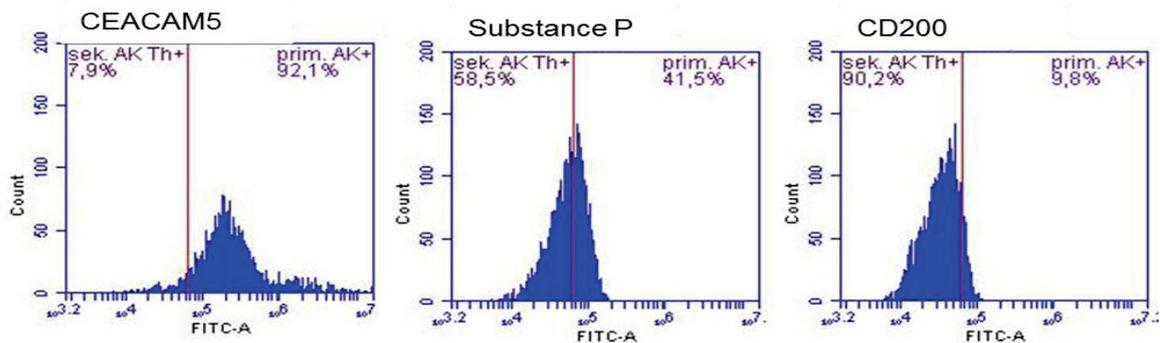
Der prozentuale Anteil der Marker-Expressionen in der 2D Co-Kultur und der 2D Coil-Kultur wurde in Abb. 24, C zusammengefasst dargestellt. Es wurden insgesamt 14 Marker der Schweißdrüse untersucht (siehe Tab. 8). Aus dieser Abbildung geht hervor, dass der prozentuale Anteil jedes Markers in der 2D Co-Kultur, bis auf Substance P, im Vergleich zur 2D Coil-Kultur deutlich höher war.

Die Marker CK19, CEACAM5, CFTR und NKCC1 kommen in der nativen Schweißdrüse sowohl im Coil als auch im Dukt vor. Diese wurden zur Identifikation und zur Differenzierung von ekkrinen Schweißdrüsenzellen einer 2D Kultur verwendet. Außerdem konnte erneut bestätigt werden, dass zur Kultivierung der 3D Modelle ausschließlich ekkrine Schweißdrüsenzellen und kein Fremdgewebe verwendet wurde. Die 2D Co-Kultur Zellpopulation zeigte einen relativ hohen Anteil dieser Marker mit ca. 96 % CFTR-Expression und ca. 90 % CEACAM5-Expression. In der 2D Coil-Kultur wurden diese Marker deutlich geringer exprimiert. CHRM3, ANO1 und AQP5 stellen spezifische Marker des Coils dar und werden nativ nicht im Dukt exprimiert.

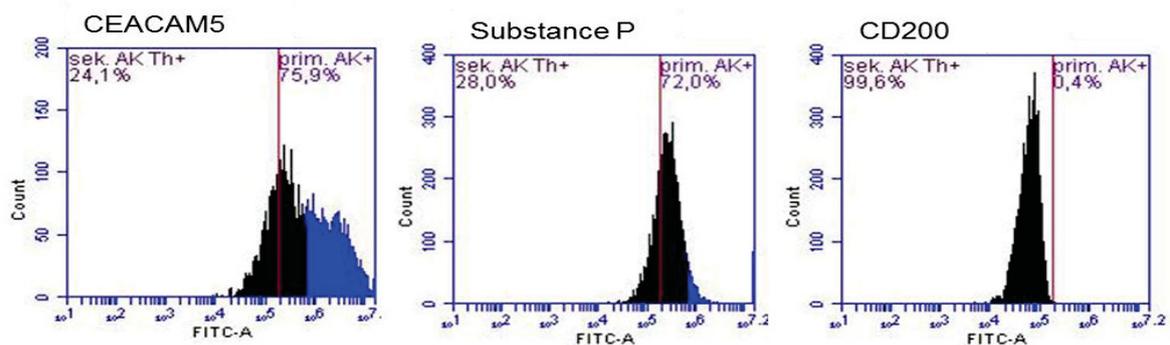
In der 2D Co-Kultur konnten mit ca. 60-70 % hohe Expressionen der Coil-Marker dokumentiert werden. Erneut zeigte sich eine stark verringerte Proteinexpression in

der 2D Coil-Kultur. GalR2 als Neuropeptid-Rezeptor, der durch Galanin angesteuert wird und dessen genauere Lokalisation noch nicht identifiziert werden konnte (Bovell *et al.*, 2013), wurde in der 2D Co-Kultur sehr hoch exprimiert. In der 2D Coil-Kultur konnte – wie bereits zuvor beschrieben – jedoch nur ein geringer Anteil GalR2-positiver Zellen detektiert werden.

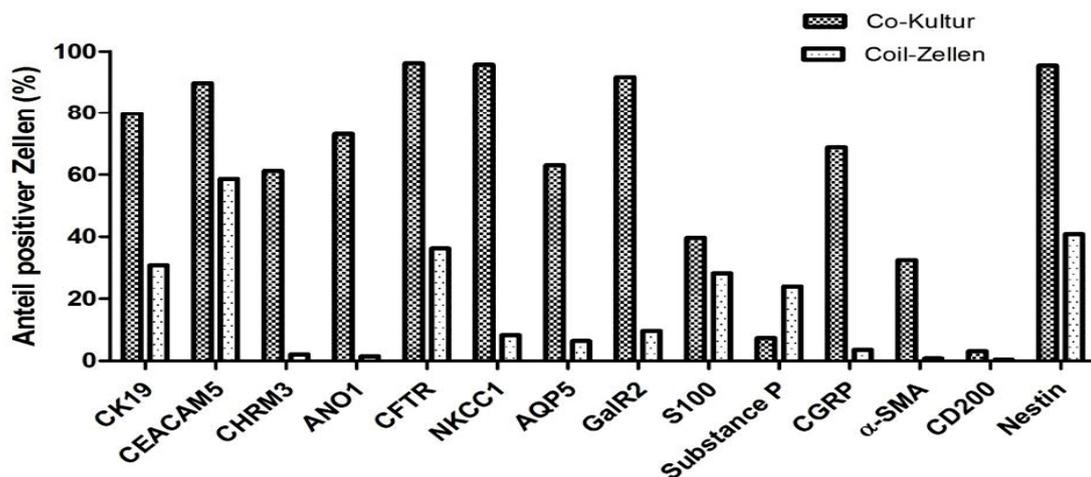
### a 2D Co-Kultur



### b 2D Coil-Zellen



### c



**Abbildung 24: Proteinexpressionsanalyse von Zellpopulationen in ekkrinen Schweißdrüsenzellen mittels Durchflusszytometrie.** Zur quantitativen Bestimmung des prozentualen Anteils der Zellpopulationen in 2D Co-Kulturen (Coil- und Dukt-Zellen) und 2D Coil-Kulturen der Schweißdrüse wurden spezifische Marker eingesetzt und in hohem Maße in der 2D Co-Kultur nachgewiesen. a+b) Exemplarische Histogramme zeigen die Häufigkeitsverteilung der Ereignisse in Abhängigkeit zur Signalstärke der Marker CEACAM5, Substance P und CD200. c) Übersicht der analysierten Marker mit Anteil der positiven Zellen in der Zellpopulation in %.

Zur Charakterisierung der Subzelltypen des Coils – *clear cells*, *dark cells* und Myoepithelzellen – wurden spezifische Marker in der Durchflusszytometrie untersucht. Zur Bestimmung der *clear cell*-Population wurde erneut Substance P verwendet. Zur Identifikation von *dark cells* wurde CGRP und zur Detektion von Myoepithelzellen wurde  $\alpha$ -SMA eingesetzt. S100 diente als Marker für *clear cells* und für Myoepithelzellen. In der 2D Co-Kultur lagen ca. 40 % S100-positive Zellen und ca. 7 % Substance P-positive Zellen vor. In der 2D Coil-Kultur wies die Zellpopulation ca. 28 % S100- und ca. 24 % Substance P-positive Zellen auf. CGRP-positive Zellen wurden in der 2D Co-Kultur mit ca. 70 % und stark verringert mit ca. 4 % in der 2D Coil-Kultur nachgewiesen. Dieses Phänomen zeigte sich ebenfalls bei  $\alpha$ -SMA. Myoepithelzellen wurden in der 2D Co-Kultur mit ca. 32 % exprimiert und konnten nur noch sehr geringfügig mit ca. 1 % in der 2D Coil-Kultur bestätigt werden.

Weiterhin wurde CD200 als Dukt-Marker nur zu ca. 3 % in der 2D Co-Kultur detektiert und nicht in der 2D Coil-Kultur festgestellt. Zur Detektion von Schweißdrüsen-abgeleiteten Stammzellen im Mesenchym (Stroma) sowie von Stammzellpopulationen innerhalb der Schweißdrüse wird der Stammzellmarker Nestin verwendet. Dieser Marker konnte in früheren Studien im Mesenchym, in den sezernierenden und ausführenden Kompartimenten der ekkrinen und auch der apokrinen Schweißdrüse aufgezeigt werden (Nagel *et al.*, 2013). In der 2D Co-Kultur exprimierten ca. 95 % der Zellen dieses Intermediärfilament sowie ca. 41 % der Zellen der 2D Coil-Kultur.

Die Daten der Durchflusszytometrie zeigten die Proteinexpression von Schweißdrüsen-spezifischen Markern sowie den prozentualen Anteil der Zellpopulationen in der 2D Co-Kultur und in der 2D Coil-Kultur (siehe auch Anhang Abb. 13). Hiermit konnte die Eignung der Marker sowie der Nachweis entscheidender Sekretions- und funktioneller Proteine in 2D Kulturen der Schweißdrüse quantitativ untersucht werden, die in das 3D Modell überführt wurden. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie aus Zellen des 3D Modells muss in weiterführenden Experimenten analysiert werden.

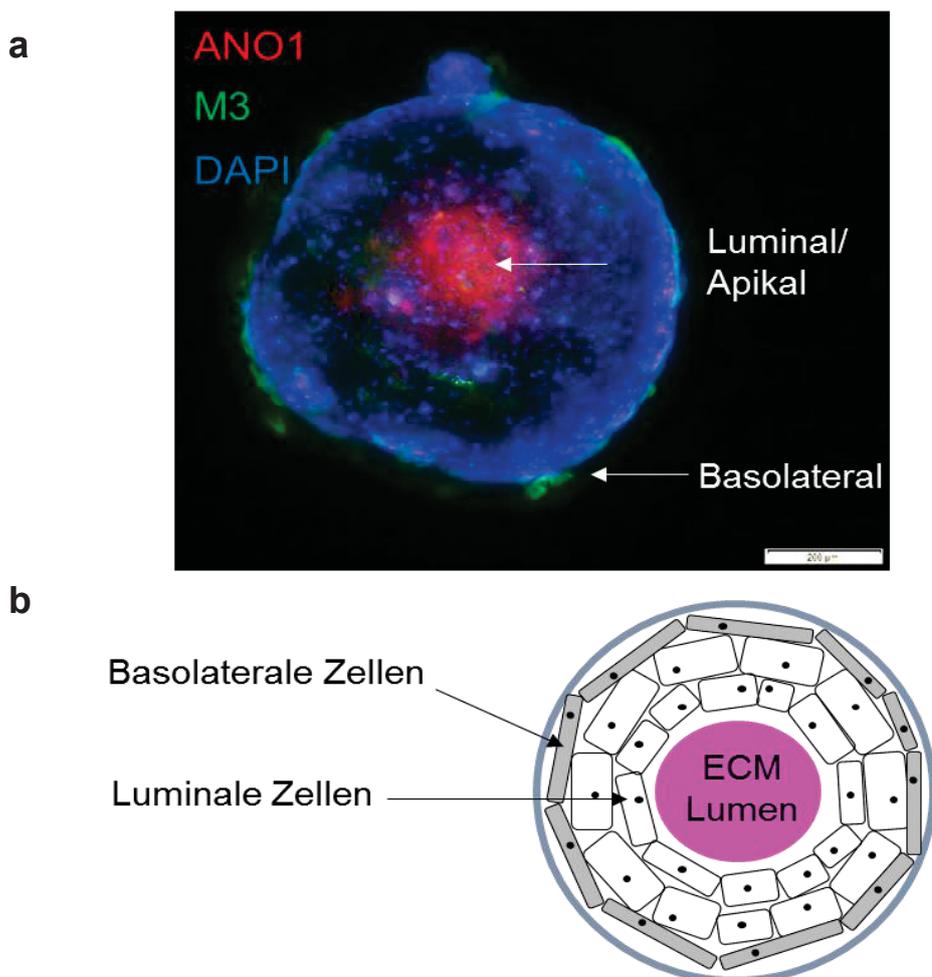
### 3.2.4 Apikal-basale Polarität in 3D Co-Kultur Modellen

Die apikal-basale Polarität spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Epithelzellen (Li *et al.*, 2015). Mithilfe der Immunfluoreszenz wurde die apikal-basale Polarität an 3D Co-Kultur Modellen analysiert. Dabei wurde CHRM3 als basaler Marker

und ANO1 als luminaler Marker verwendet. Beide kommen nur im sezernierenden Coil vor und sind daher Coil-spezifisch. Zuvor konnte in der quantitativen Durchflusszytometrie gezeigt werden (siehe 3.2.3), dass ein hoher prozentualer Anteil der Zellpopulation Coil-Marker exprimiert.

In der *whole mount*-Immunfluoreszenzfärbung des 3D Co-Kultur Modells wurde sowohl der Marker ANO1 als auch der Marker CHRM3 nachgewiesen (Abb. 25, A). ANO1 wurde apikal und CHRM3 basal (basolateral) exprimiert. Somit geht die apikal-basale Polarität und die Orientierung der Zellen im 3D Co-Kultur Modell aus der Co-Lokalisation der Immunfluoreszenzfärbung hervor.

Ein denkbarer Aufbau des 3D Modells der Schweißdrüse wurde schematisch in Abb. 25, C dargestellt und fasst die zuvor beschriebenen Daten zusammen, die die apikal-basale Polarität der differenzierten Zellen im 3D Modell widerspiegeln.



**Abbildung 25: Apikal-basale Polarität in 3D Co-Kultur Modellen der Schweißdrüse.** a) *Whole mount*-Immunfluoreszenzfärbung zeigte ANO1 als luminalen (rot) und CHRM3 als basalen Marker (grün) im 3D Co-Kultur Modell. DAPI (blau) markierte die Zellkerne. Maßstab entspricht 200 µm. b) Schema eines 3D Modells mit zentralem Lumen oder extrazellulärer Matrix (ECM), luminalen Zellen, basalen Zellen und einer äußeren Membran.

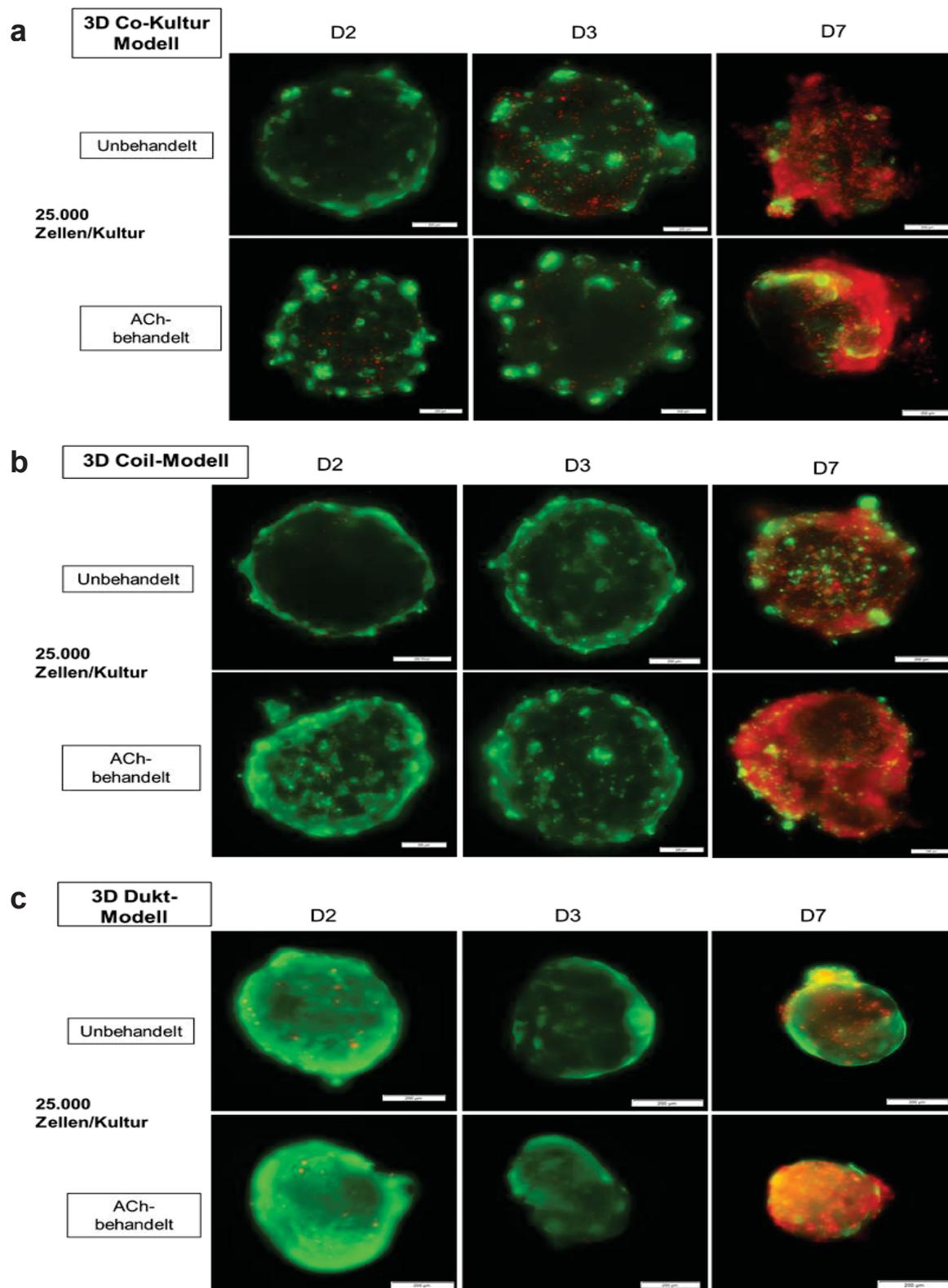
### **3.3 Cholinerge Stimulation und Ca<sup>2+</sup>-Signalling in 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse**

Durch die Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>-Signaltransduktion kommt es im sezernierenden Coil zur Bildung von Primärschweiß. Dies stellt die Hauptaufgabe und -funktion der ekkrinen Schweißdrüse dar (Sato, 1977). Die physiologischen und organotypischen Funktionen wurden durch die cholinerge Stimulation der 3D Modelle analysiert.

#### **3.3.1 Einfluss von ACh auf die Viabilität von 3D Modellen**

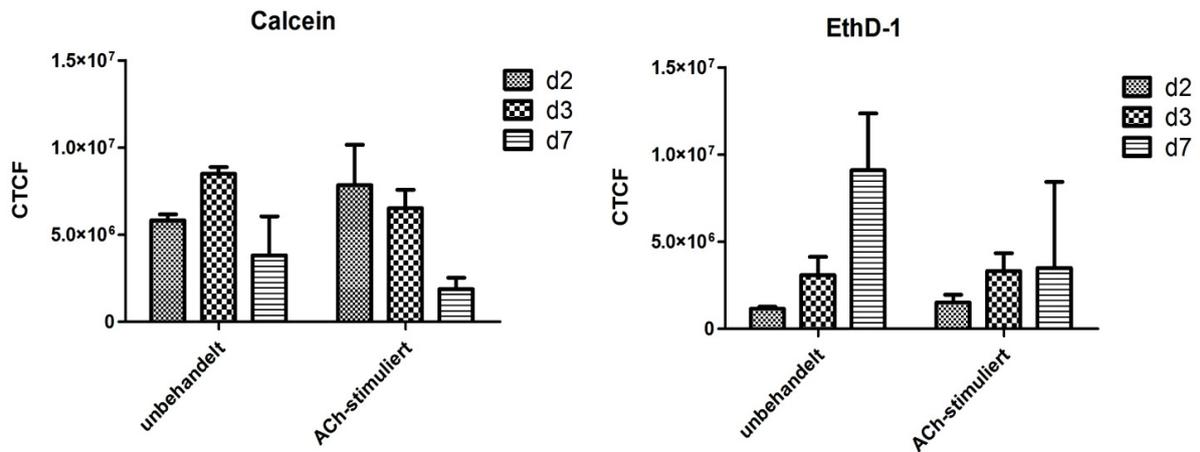
Wie bereits in 3.1.4 beschrieben, wurde die Viabilität mittels Live-Dead Assay im 3D Modell untersucht. In einer weiteren Analyse wurde hier der Einfluss von ACh auf die Viabilität in 3D Co-Kultur Modellen, in 3D Coil-Modellen und in 3D Dukt-Modellen mit 25.000 Zellen bei Einsaat pro Kultur analysiert. Dabei wurde der cholinerge Neurotransmitter ACh bei der Kultivierung in das Medium zugesetzt und die Viabilität mittels Fluoreszenz standardmäßig an den Tagen D2, D3 und D7 überprüft sowie quantifiziert (siehe 2.2.3.3).

Anhand des „Lebendfarbstoffs“ Calcein AM und des „Totfarbstoffs“ EthD-1 wurde der Lebend-Tot-Anteil der Zellen im 3D Modell bestimmt und die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe quantifiziert (Abb. 26+27). Die Viabilität, die durch die grüne Fluoreszenzfärbung des Farbstoffs Calcein ermittelt wurde, nahm mit zunehmender Kultivierungszeit von D2 bis D7 unabhängig vom Zelltyp in den 3D Modellen ab (Abb. 26a-c). Somit korrelierte die Viabilität der Zellen und die Zelltodrate im 3D Modell mit der Kultivierungszeit und wurde geringfügig vom Zelltyp beeinflusst. Die Quantifizierung des roten Fluoreszenzfarbstoffs EthD-1 zeigte bei der Behandlung der Modelle mit ACh aufgrund des Standardfehlers nur geringfügige Unterschiede in der Zelltodrate (Abb. 27a-c).

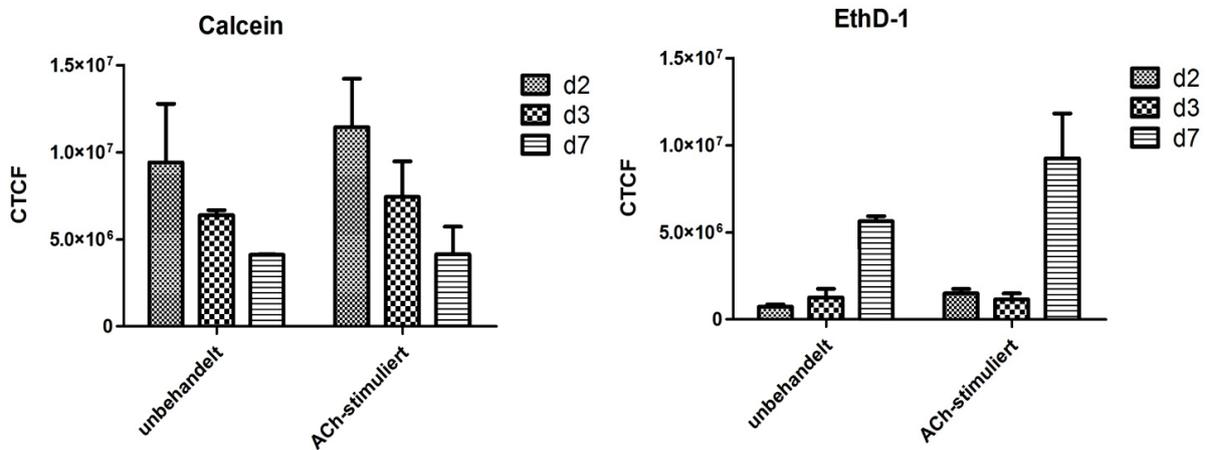


**Abbildung 26: Einfluss von ACh auf die Viabilität von 3D Modellen.** Der Live-Dead Assay wurde an (a) 3D Co-Kultur Modellen, an (b) 3D Coil-Modellen und an (c) 3D Dukt-Modellen der Schweißdrüse mit 25.000 Zellen/Kultur an den Tagen D2, D3 und D7 durchgeführt. Die ACh-Behandlung und damit die cholinerge Stimulation wurde im Vergleich zum Kulturmedium (unbehandelt) eingesetzt. Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

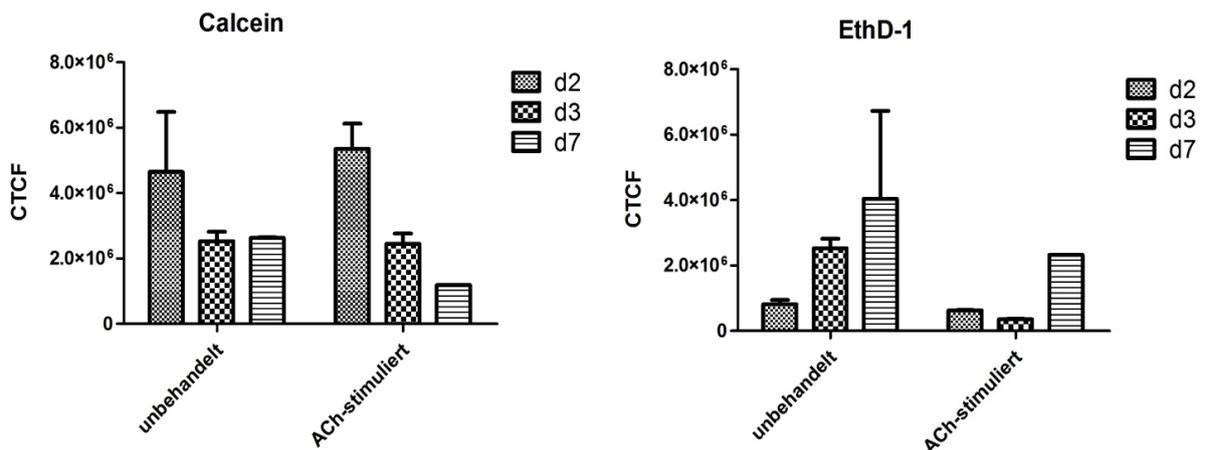
### a) 3D Co-Kultur Modell



### b) 3D Coil-Modell



### c) 3D Dukt-Modell



**Abbildung 27: Quantifizierung der Fluoreszenzfarbstoffe Calcein und EthD-1 im Live-Dead Assay von ACh-stimulierten 3D Modellen.** 3D Co-Kultur Modelle, 3D Coil Modelle und 3D Dukt Modelle mit je 25.000 Zellen/Kultur wurden im Live-Dead Assay an D2, D3 und D7 auf ihre Viabilität und den Zelltod untersucht. Die 3D Modelle wurden entweder mit ACh stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden als *corrected total cell fluorescence* (CTCF) dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Student's t-Test mit  $n=3 \pm \text{SEM}$  bestimmt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und ACh-stimulierten 3D Modellen an D2, D3 bzw. D7 festgestellt.

Dabei wiesen die 3D Co-Kultur Modelle an D7 nach ACh-Stimulation leicht verringerte Raten des Zelltods auf (Abb. 27a). Dies konnte auch an D3 bei 3D Dukt-Modellen beobachtet werden. In 3D Dukt-Modellen lagen zudem enorme Schwankungen an D7 vor. In 3D Coil-Modellen konnte ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden, da der Zelltod mit ACh-Stimulation an D7 leicht zunahm (Abb. 27b). Außerdem wurden in 3D Dukt-Modellen gesamt verringerte Intensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe nachgewiesen (Abb. 27c).

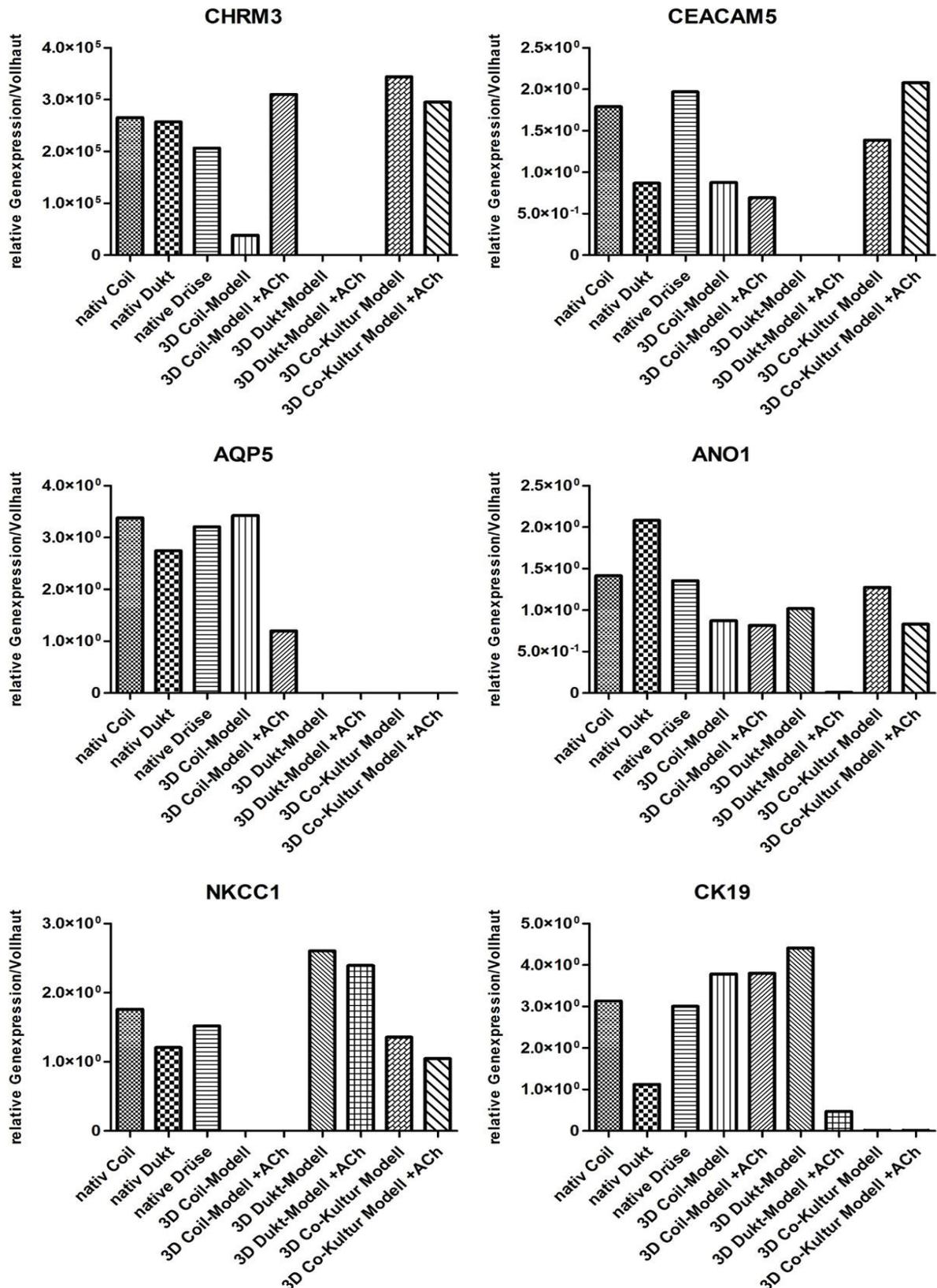
Zusammenfassend konnte mittels des Live-Dead Assays gezeigt werden, dass die Behandlung der 3D Modelle mit ACh keine signifikanten Auswirkungen auf die Viabilität hatte.

### **3.3.2 Untersuchung der Genexpression nach cholinergem Stimulus**

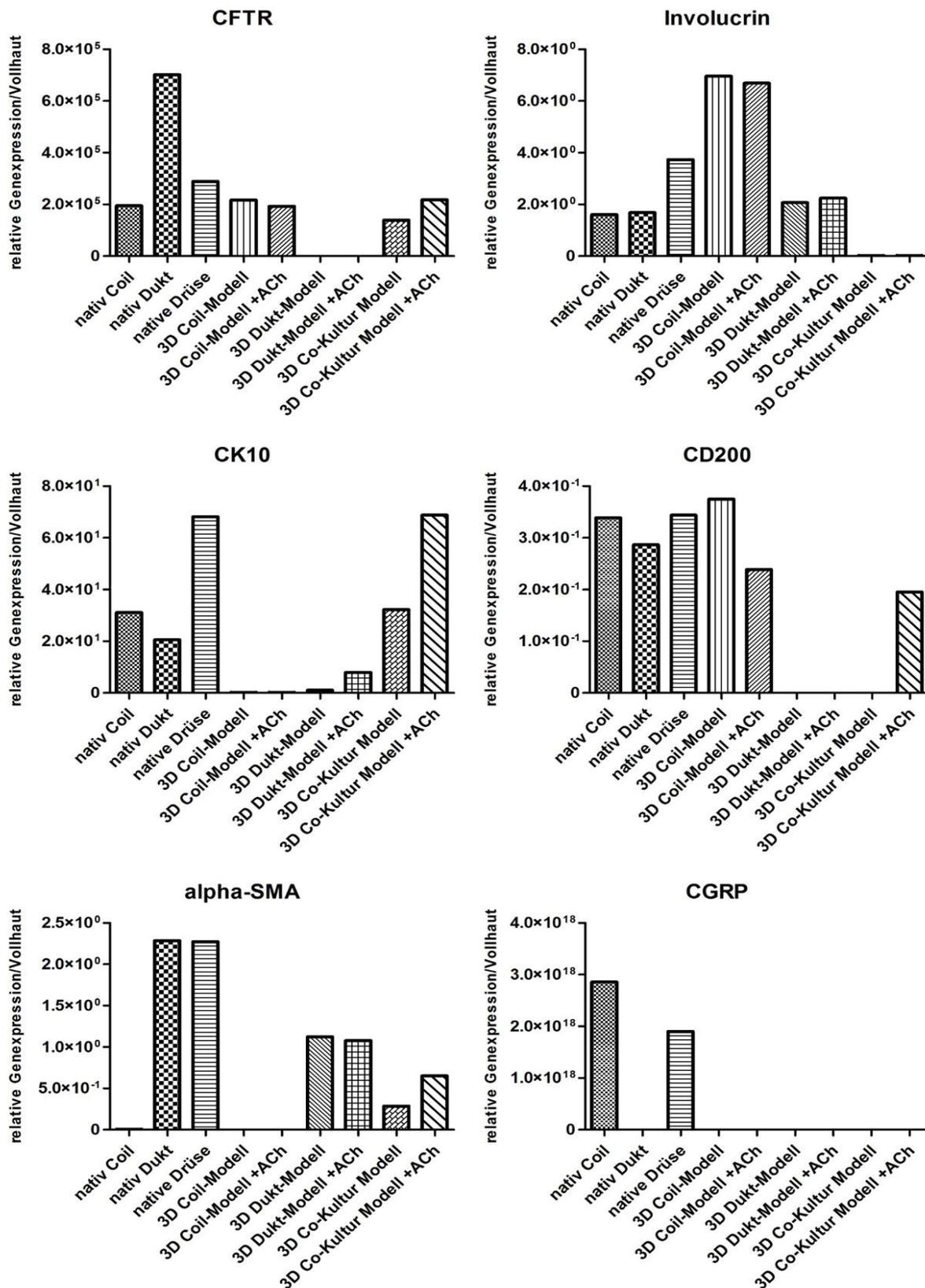
#### **3.3.2.1 Genexpressionsanalyse mittels Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung**

Zur Analyse des gesamten Transkriptoms und damit der synthetisierten RNA der etablierten 3D Modelle wurde eine Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung mithilfe der sog. Next Generation Sequenzierung durchgeführt (siehe 2.2.5.4). So wurden insgesamt über 26.000 transkribierte Gene in den Proben nachgewiesen und quantifiziert. Mithilfe dieser Analyse konnte auch eine Vielzahl von charakteristischen Genen, welche spezifisch für die humane ekkrine Schweißdrüse sind, detektiert werden. Zudem wurden die 3D Modelle bei ihrer Kultivierung einem externen, cholinergen Stimulus mittels ACh ausgesetzt, um eine mögliche Genexpressionsänderung des Transkriptoms feststellen zu können.

Zur Identifikation der Schweißdrüsen-spezifischen Marker (siehe Tab. 2+8) wurde Humanhaut („Vollhaut“) als Referenz in der Analyse mitgeführt. Dabei wurden die Expressionswerte der Proben mit dem Expressionswert der Referenz normiert, sodass hier nur die relativen Genexpressionsdaten dargestellt wurden. In der NGS-Analyse wurden unterschiedliche Transkriptom-Analysen durchgeführt: (a) die native ekkrine Schweißdrüse mit Coil- und Dukt-Kompartiment („nativ gesamt“), (b) die separierten nativen Kompartimente des Coils bzw. (c) Dukts sowie (d-i) verschiedene Proben der 3D Modelle. Dabei wurden die 3D Modelle in ihren drei Ausführungsformen (Co-Kultur, Coil, Dukt) und nach ACh-Stimulation untersucht. In Abb. 28-29 wurde exemplarisch die relative Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Gene aus den Sequenzierungsdaten dargestellt.



**Abbildung 28: Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Modellen nach cholinergischer Stimulation mittels NGS-Analyse.** Aus der Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung wurden die oben genannten Marker in nativem Gewebe (gesamte Drüse, Coil, Dukt) und in 3D Modellen (Co-Kultur, Coil, Dukt) analysiert und hier exemplarisch dargestellt. Die Modelle wurden durch ACh stimuliert. Die Genexpression der Probe wurde auf die Genexpression der Vollhautprobe normiert.



**Abbildung 29: Genexpression spezifischer Marker der Subzelltypen der Schweißdrüse in 3D Modellen nach cholinergischer Stimulation mittels NGS-Analyse.** Aus der Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung wurden diese Marker in nativem Gewebe (gesamte Drüse, Coil, Dukt) und in 3D Modellen (Co-Kultur, Coil, Dukt) analysiert und hier exemplarisch dargestellt. Die Modelle wurden durch ACh stimuliert. Die Genexpression der Probe wurde auf die Genexpression der Vollhautprobe normiert.

Die spezifischen Gene zur Charakterisierung der ekkrinen Schweißdrüse mittels NGS-Analyse (CHRM3, CEACAM5, AQP5, ANO1, NKCC1, CK19, CFTR, Involucrin, CK10, CD200,  $\alpha$ -SMA, CGRP) zeigten unterschiedliche Genexpressionsmuster im nativen Gewebe und in den 3D Modellen (Abb. 28+29).

Im nativen *in vivo* Gewebe wurden insbesondere zwischen den nativen Kompartimenten des Coils und des Dukts Expressionsunterschiede der spezifischen Gene erkannt. Das Coil exprimiert verstärkt die Gene CEACAM5, CK19 und CGRP, wohingegen im Dukt die Gene ANO1, CFTR und  $\alpha$ -SMA erhöht nachgewiesen wurden. Die Gene CHRM3, AQP5, NKCC1, Involucrin, CK10 und CD200 zeigten kaum Unterschiede in ihrer Expression. Bei Analyse der Genexpression in der gesamten nativen Drüse wurden fast identische Ergebnisse zum nativen Coil erzielt.

Im 3D Co-Kultur Modell wurden die Gene CHRM3, CEACAM5, ANO1, CFTR und CK10 im Vergleich zum 3D Coil- und zum 3D Dukt-Modell insgesamt höher exprimiert. Außerdem wurden diese Gene in den 3D Co-Kultur Modellen auf Genexpressionsebene der nativen *in vivo* Drüsen exprimiert. AQP5, CK19, Involucrin und CGRP konnten in 3D Co-Kultur Modellen nicht bzw. kaum nachgewiesen werden. Eine induzierte Genexpression durch cholinerge Stimulation wurde nur bei den Markern CEACAM5, CK10, CD200 und  $\alpha$ -SMA beobachtet.

In 3D Coil-Modellen konnte CHRM3, CEACAM5, AQP5, ANO1, CK19, CFTR, Involucrin und CD200 nachgewiesen werden. Die Gene AQP5, CK19 und Involucrin, die im 3D Co-Kultur Modell auf Genexpressionsebene nicht vorhanden waren, wurden hier exprimiert. CD200 wurde in 3D Coil-Modellen im Vergleich zum 3D Co-Kultur Modell verstärkt exprimiert. Die Marker NKCC1, CK10,  $\alpha$ -SMA und CGRP konnten in 3D Coil-Modellen keine Genexpression aufweisen. Hingegen wurden die exprimierten Gene (AQP5, ANO1, CK19, CFTR, CD200) in 3D Coil-Modellen größtenteils wie *in vivo* exprimiert. Durch ACh konnte besonders bei CHRM3 eine induzierte Genexpression gezeigt werden. Nach cholinenger Stimulation wurde AQP5 stark und CD200 leicht reprimiert exprimiert.

In 3D Dukt-Modellen konnte keine hohe Anzahl der Schweißdrüsen-spezifischen Gene detektiert werden. Allerdings wurde im nativen Dukt CHRM3, CEACAM5, AQP5, ANO1, NKCC1, CK19, CFTR, Involucrin, CK10, CD200 und  $\alpha$ -SMA exprimiert. Im Vergleich zum nativen Coil wurden die Gene ANO1, CFTR und  $\alpha$ -SMA dabei verstärkt

im nativen Dukt-Kompartiment nachgewiesen. Daher sollten diese Gene auch in 3D Dukt-Modellen exprimiert werden. Jedoch konnten nur die Genexpressionen von ANO1, NKCC1, CK19, Involucrin, CK10 und  $\alpha$ -SMA detektiert werden. Nicht in 3D Dukt-Modellen exprimiert wurden CHRM3, CEACAM5, AQP5, CFTR, CD200 und CGRP. In 3D Dukt-Modellen wurde bei CK10 eine ACh-induzierte Genexpression, bei ANO1 und CK19 eine ACh-reprimierte Genexpression beobachtet.

### 3.3.2.2 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

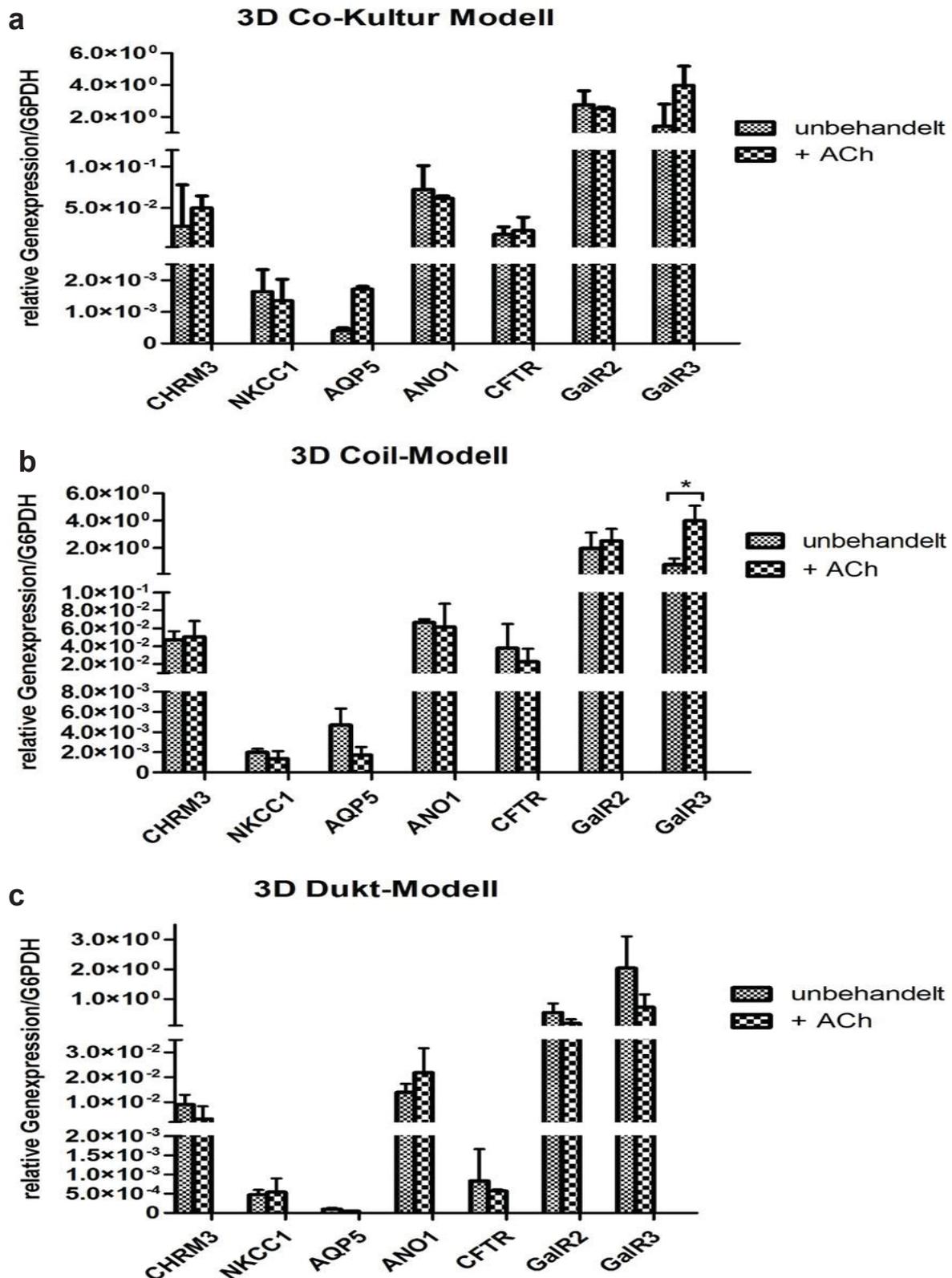
Neben der Viabilitäts-Analyse und der Gesamt-Transkriptom-Sequenzierung wurde auch die Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker (CHRM3, NKCC1, AQP5, ANO1, CFTR, GalR2, GalR3) nach cholinergem ACh-Stimulation mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 30).

Im 3D Co-Kultur Modell (Abb. 30a) wurde durch die ACh-Behandlung keine reprimierte Genexpression identifiziert. Die Gene CHRM3, NKCC1, ANO1, CFTR und GalR2 zeigten ähnliche Genexpressionslevel dieser spezifischen Marker der Schweißdrüse im unbehandelten Zustand und nach cholinergem Stimulation. Eine stark induzierte Genexpression in den 3D Co-Kultur Modellen konnte bei AQP5 und GalR3 beobachtet werden.

Im 3D Coil-Modell (Abb. 30b) wurde die Genexpression von GalR3 durch die ACh-Stimulation signifikant induziert. Die Gene CHRM3, ANO1 und GalR2 wiesen ähnliche Expressionslevel in unbehandelten und in ACh-behandelten 3D Coil-Modellen auf. NKCC1, AQP5 und CFTR wurden reduziert exprimiert.

Im 3D Dukt-Modell (Abb. 30c) wurden teilweise geringere Expressionen der Gene im Vergleich zum 3D Co-Kultur Modelle oder zum 3D Coil-Modell detektiert, wie z.B. CFTR. Die ACh-Behandlung bewirkte in 3D Dukt-Modellen keine Änderung in der Expression von CHRM3, NKCC1 und CFTR. Die Gene AQP5, GalR2 und GalR3 wurden jedoch reprimiert exprimiert. Eine induzierte Genexpression nach ACh-Stimulation lag nur bei dem Marker ANO1 vor.

Die Daten zeigten zudem, dass hohe Genexpressionslevel für die Marker GalR2 und GalR3, identifiziert werden konnten.



**Abbildung 30: Einfluss von ACh auf die Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Modellen der humanen Schweißdrüse.** Die relative Genexpression wurde mittels qRT-PCR in (a) 3D Co-Kultur Modellen, in (b) 3D Coil-Modellen und in (c) 3D Dukt-Modellen anhand Schweißdrüsen-spezifischer Marker (CHR3, NKCC1, AQP5, ANO1, CFTR, GalR2, GalR3) analysiert. Die 3D Modelle wurden jeweils mit 25.000 Zellen/Kultur bei Einsaat hergestellt und nach ACh-Behandlung an D3 analysiert. G6PDH wurde als *housekeeping gene* verwendet. Student's t-Test mit  $n=3 \pm \text{SEM}$  und  $p < 0,05$  (\*).

Tabelle 11 fasst die Genexpressionen der Marker in 3D Modellen der Schweißdrüse nach ACh-Behandlung zusammen. Dabei wurden die relativen Expressionslevel der unbehandelten 3D Modelle mit den ACh-behandelten 3D Modellen verglichen.

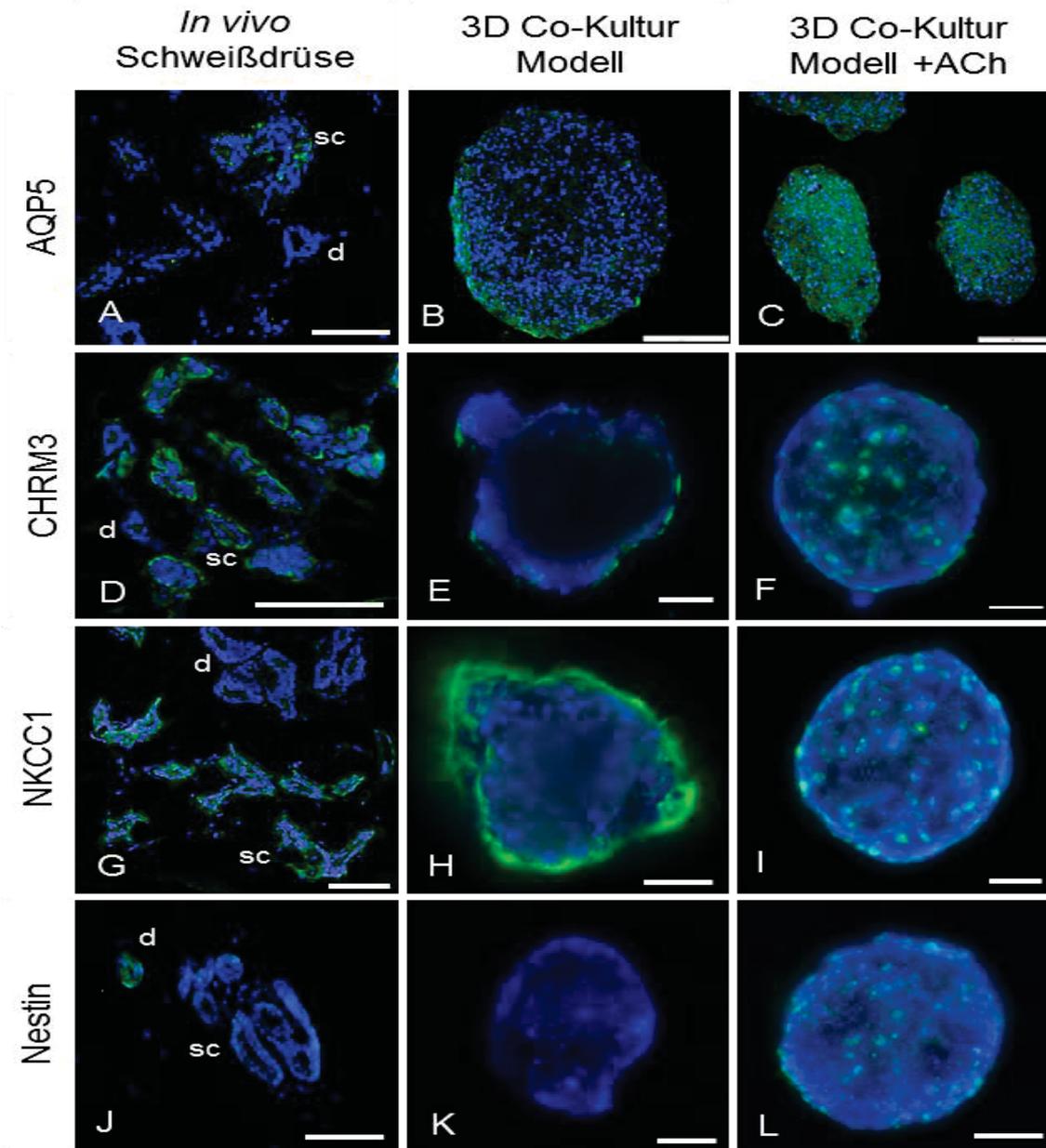
**Tabelle 11: Übersicht der Genexpressionsänderungen nach cholinergem Stimulation von 3D Modellen.** Die Genexpressionsänderungen wurden unterteilt in: + induzierte Expression, +/- keine Expressionsänderung, - reprimierte Expression.

Marker	3D Co-Kultur Modell + ACh	3D Coil-Modell + ACh	3D Dukt-Modell + ACh
CHRM3	+	+	+/-
NKCC1	+/-	+	+/-
AQP5	+	+	-
ANO1	+/-	+	+
CFTR	+/-	+	+/-
GalR2	+/-	+	-
GalR3	+	+	-

In dieser Analyse wurde die Expression der Schweißdrüsen-spezifischen Markergene nach deren Kultivierung mit ACh in 3D Co-Kultur Modellen, in 3D Coil-Modellen und 3D Dukt-Modellen untersucht. Dabei wurden Gene identifiziert, die nicht bzw. kaum durch cholinerge Stimulation beeinflusst wurden. Dabei unterschieden sich jedoch die Genexpressionen der Schweißdrüsen-spezifischen Marker je nach Zelltyp des 3D Modells (Co-Kultur, Coil, Dukt).

### 3.3.3 Proteinexpressionsanalyse Schweißdrüsen-spezifischer Marker nach cholinergem Stimulation

Der Einfluss von ACh auf die Viabilität und auf die Genexpression wurde bereits in 3.3.1-3.3.2 beschrieben. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde zudem die Proteinexpression nach cholinergem Stimulation mit ACh an 3D Co-Kultur Modellen analysiert. Abb. 31 veranschaulicht die Proteinexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker in nativen ekkrinen Schweißdrüsen im Hautschnitt, in 3D Co-Kultur Modellen und in ACh-stimulierten 3D Co-Kultur Modellen. Dabei wurden der Wasserkanal AQP5, der muskarine Rezeptor CHRM3, der Ionen-Cotransporter NKCC1 und der Stammzellmarker Nestin untersucht.



**Abbildung 31: Einfluss von ACh auf die Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Co-Kultur Modellen.** Die Proteinexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker (AQP5, CHRM3, NKCC1, Nestin) wurde in der nativen Drüse (A, D, G, J) mit den Kompartimenten des sezernierenden Coils (sc) und des Dukts (d) sowie im 3D Co-Kultur Modell (unbehandelt bzw. ACh-stimuliert) analysiert. *Whole mount* Färbungen (E, F, H, I, K, L) sowie Schnitte (B, C) der 3D Modelle zeigten induzierte Proteinexpressionen. Maßstab entspricht 100  $\mu$ m bzw. 200  $\mu$ m (B, C).

In den 3D Co-Kultur Modellen konnte nach ACh-Behandlung eine stark induzierte Expression der Proteine AQP5, CHRM3, NKCC1 und Nestin beobachtet werden. Die unbehandelten Modelle zeigten verstärkte Expression von AQP5, CHRM3 und NKCC1 im basolateralen Bereich der 3D Co-Kultur Modelle. In unbehandelten 3D Co-Kultur Modellen wurde keine Nestin-Expression nachgewiesen. Nach cholinergischer Stimulation

wurden die induziert exprimierten Proteine der zuvor genannten Marker (AQP5, CHRM3, NKCC1, Nestin) durch die Verteilung im gesamten Konstrukt erkennbar, insbesondere der Schweißdrüsen-spezifische Marker AQP5.

### **3.3.4 Proteinexpression von AQP5 nach cholinergem Stimulation mittels Western Blot-Analyse**

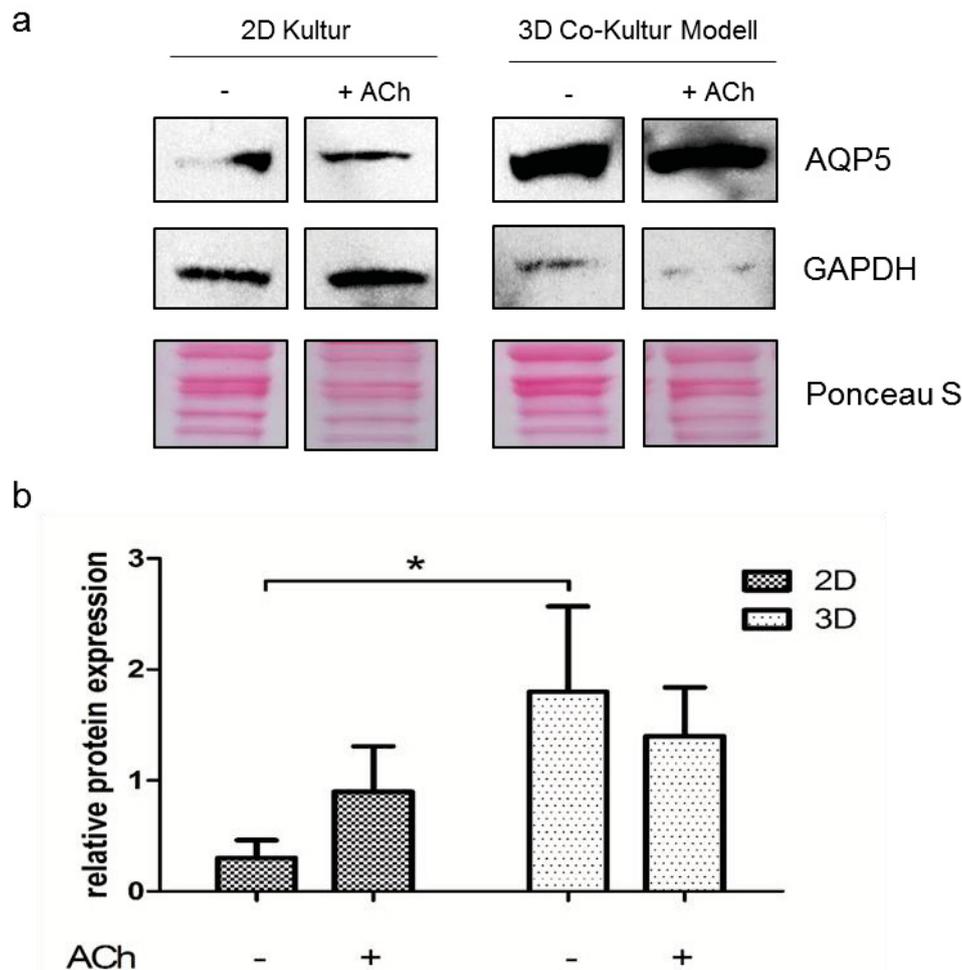
Nach der Analyse der Viabilität, der Genexpression sowie der Proteinexpression von Schweißdrüsen-spezifischen Markern in ACh-stimulierten 3D Modellen wurde AQP5 als Sekretionsmarker im Western Blot quantitativ nachgewiesen. Dabei wurde die Gesamtmenge des synthetisierten Proteins und Wasserkanals AQP5 in der 2D Kultur und im 3D Co-Kultur Modell betrachtet. Die ACh-Stimulation der Kulturen wurde als natürlicher, physiologischer Trigger des Sekretionsmechanismus von ekkrinen Schweißdrüsen eingesetzt (Cui & Schlessinger, 2015; Saint-Criq & Gray, 2017; Sato *et al.*, 1989).

Die Abb. 32 zeigt die Proteinexpression von AQP5 und die Ladekontrollen GAPDH sowie die Ponceau S-Färbung in der 2D Kultur und im 3D Co-Kultur Modell in der Western Blot-Analyse (Abb. 32a). Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert (Abb. 32b). Dabei wurden die GAPDH-Ladekontrollen im Verhältnis zur AQP5-Proteinmenge als relative Proteinexpression kalkuliert.

Die Ponceau S-Färbung wies die insgesamt transferierten Proteine auf der Nitrocellulose-Membran nach dem Blotting nach. Somit wurden Proteine mit identischem Molekulargewicht auf einer Position angefärbt, die klar abgrenzende Banden mit ähnlicher Intensität der vier analysierten Proben zeigten (Abb. 32a). Zum spezifischem Nachweis und zur Normierung der Proteinmengen wurde der Antikörper GAPDH als weitere Ladekontrolle verwendet. In der 2D Kultur konnte GAPDH im unbehandelten und ACh-stimulierten Zustand ähnlich stark nachgewiesen werden. In 3D Co-Kultur Modellen wurde das GAPDH-Protein nur gering detektiert.

AQP5 wurde sowohl in der 2D Kultur als auch im 3D Co-Kultur Modell nachgewiesen (Abb. 32a). In unbehandelten 3D Co-Kultur Modellen lag verglichen mit der unbehandelten 2D Kultur eine um das ca. 4x erhöhte AQP5-Proteinexpression vor. Dies wurde anhand der Bandenintensitäten (Abb. 32a) sowie nach Quantifizierung sichtbar (Abb. 32b). 2D Kulturen wiesen nach cholinergem Stimulation eine induzierte

AQP5-Expression auf, die jedoch nicht signifikant war. Dies wurde im 3D Co-Kultur Modell nicht erzielt, da keine AQP5-Proteinexpressionsänderung nach ACh-Stimulation nachgewiesen wurde. Diese war zwar leicht reduziert, allerdings lag keine statistische Signifikanz vor. In ACh-stimulierten 3D Co-Kultur Modellen wurde AQP5 dennoch im Vergleich zur ACh-stimulierten 2D Kultur ca. 1,5x erhöht exprimiert.



**Abbildung 32: Nachweis von AQP5 in der 2D Kultur sowie im 3D Co-Kultur Modell mittels Western Blot-Analyse.** a) AQP5 als Sekretionsmarker des sezernierenden Coils wurde in 2D Kulturen und im 3D Co-Kultur Modell nach cholinergem Stimulation mit ACh nachgewiesen. GAPDH und Ponceau S-Färbung dienten als Ladekontrollen. b) Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mittels Total LabQuant Software aus  $n=3 \pm \text{SEM}$ . Im Student's t-Test wurden Unterschiede mit  $p < 0,05$  (\*) als statistisch signifikant betrachtet.

Zusammengefasst konnte AQP5 spezifisch in der primären 2D Kultur und im 3D Co-Kultur Modell identifiziert und quantifiziert werden. Dabei wurde eine signifikant erhöhte AQP5-Proteinexpression in unbehandelten 3D Co-Kultur Modell im Vergleich zur unbehandelten 2D Kultur nachgewiesen (Abb. 32b). In der ACh-stimulierten 2D

Kultur konnte im Vergleich zur unbehandelten 2D Kultur eine leichte Zunahme der AQP5-Proteinmenge nachgewiesen werden, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Hingegen wurde durch die cholinerge Stimulation mit ACh im 3D Co-Kultur Modell keine Zunahme und damit kein statistisch signifikanter Unterschied in der AQP5-Proteinexpression erzielt.

### **3.3.5 Nachweis des $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in ekkrinen Schweißdrüsenzellen**

$\text{Ca}^{2+}$  stellt einen ubiquitären Neurotransmitter dar, welcher als *second messenger* (sekundärer Botenstoff) fungiert. Dabei ist er für die Signalübertragung verantwortlich, d.h. er überträgt ein extrazelluläres Primärsignal zu einem intrazellulären Signal bzw. einer Signalkaskade.  $\text{Ca}^{2+}$  dient neben cAMP als Haupt-Regulator des ekkrinen Sekretionsmechanismus (Bovell, 2015).

Zur Analyse des physiologischen Reaktionsvermögens der humanen Primärzellen der ekkrinen Schweißdrüse wurde der Calcium Flux Assay in der 2D Kultur sowie im 3D Co-Kultur Modell angewandt (siehe 2.2.7). Das Fluorophor Fluo-4 AM wurde dabei als  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator verwendet, welches intrazellulär durch die Hydrolyse der Esterbindung zu Fluo-4 gespalten wird und dann bei der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  erhöhte Fluoreszenz aufweist. Damit lässt sich die Änderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels nach Behandlung der Kulturen mit stimulierenden Reagenzien und Agonisten sowie inhibierenden Substanzen und Antagonisten messen.

#### **3.3.5.1 Pharmakologische Reagenzien im Calcium Flux Assay**

Pharmakologische Reagenzien, wie beispielsweise muskarine Agonisten (Pilocarpin, Carbachol) und Antagonisten (Glykopyrrolat, Atropin), ahmen aufgrund ihrer Strukturanalogie Rezeptorliganden nach und aktivieren bzw. hemmen somit bestimmte Signalwege. Demzufolge werden solche cholinergen Substanzen in Studien zur Untersuchung der ekkrinen Schweißsekretion eingesetzt (Cui & Schlessinger, 2015). In Tab. 12 wurden diese Reagenzien, deren spezifische Targets und deren erwartete Wirkung auf das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Level im Calcium Flux Assay zusammengefasst.

**Tabelle 12: Stimulation und Inhibition von Ionenkanälen sowie Rezeptoren der ekkrinen Schweißdrüse durch den Einsatz von Agonisten und Antagonisten.** Modifiziert nach Cui & Schlessinger (Cui & Schlessinger, 2015).

Substanz	Effekt	Target
Acetylcholin (ACh)	↑	Muskariner ACh-Rezeptor-Agonist (z.B. CHR3)
Pilocarpin	↑	Muskariner ACh-Rezeptor-Agonist (z.B. CHR3)
Carbachol	↑	Muskariner und nikotinischer ACh-Rezeptor-Agonist (z.B. CHR3)
ATP	↑	Purinerger Rezeptor-Agonist
Glykopyrrolat	↓	Muskariner ACh-Rezeptor-Antagonist (z.B. CHR3)
Kaliumsulfat	?	Kalium-Kanäle ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ , NKCC1, KCNN4, KCNN5)
Weitere Antagonisten (hier nicht analysiert):		
Atropin	↓	Muskariner ACh-Rezeptor-Antagonist (z.B. CHR3)
Ouabain	↓	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ Inhibitor
Benzamil	↓	ENaC Inhibitor
Amilorid	↓	ENaC Inhibitor + $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ Exchange Blocker (Diuretikum)

Neben der cholinergen Stimulation, die über muskarine ACh-Rezeptoren verläuft, werden ekkrine Schweißdrüsen durch  $\alpha\beta$ -adrenerge und purinerge Agonisten aktiviert. Diese Signalkaskade kann durch spezifische Antagonisten gehemmt werden. Weiterhin sind pharmakologische Reagenzien bekannt, die spezifisch Ionenkanäle der ekkrinen Schweißdrüse hemmen (Ouabain, Benzamil, Amilorid) und somit die Sekretion mindern bzw. inhibieren können. Des Weiteren können auch Ionenlösungen eingesetzt werden, die wahrscheinlich eine Änderung des Membranpotenzials bewirken und/oder spannungsabhängige Ionenkanäle in der ekkrinen Schweißdrüse beeinflussen (Hertz *et al.*, 2013).

Einige dieser Reagenzien wurden daher im Calcium Flux Assay getestet und deren Wirkung auf das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Level analysiert. Vor Einsatz dieser Reagenzien wurde die Zytotoxizität und somit die Einsatzkonzentrationen mittels des WST-1-Tests bestimmt (siehe 2.2.2.6 und im Anhang Abb. 36+37).

### 3.3.5.2 Wirkung von Agonisten und Antagonisten in 3D Co-Kultur Modellen im Calcium Flux Assay

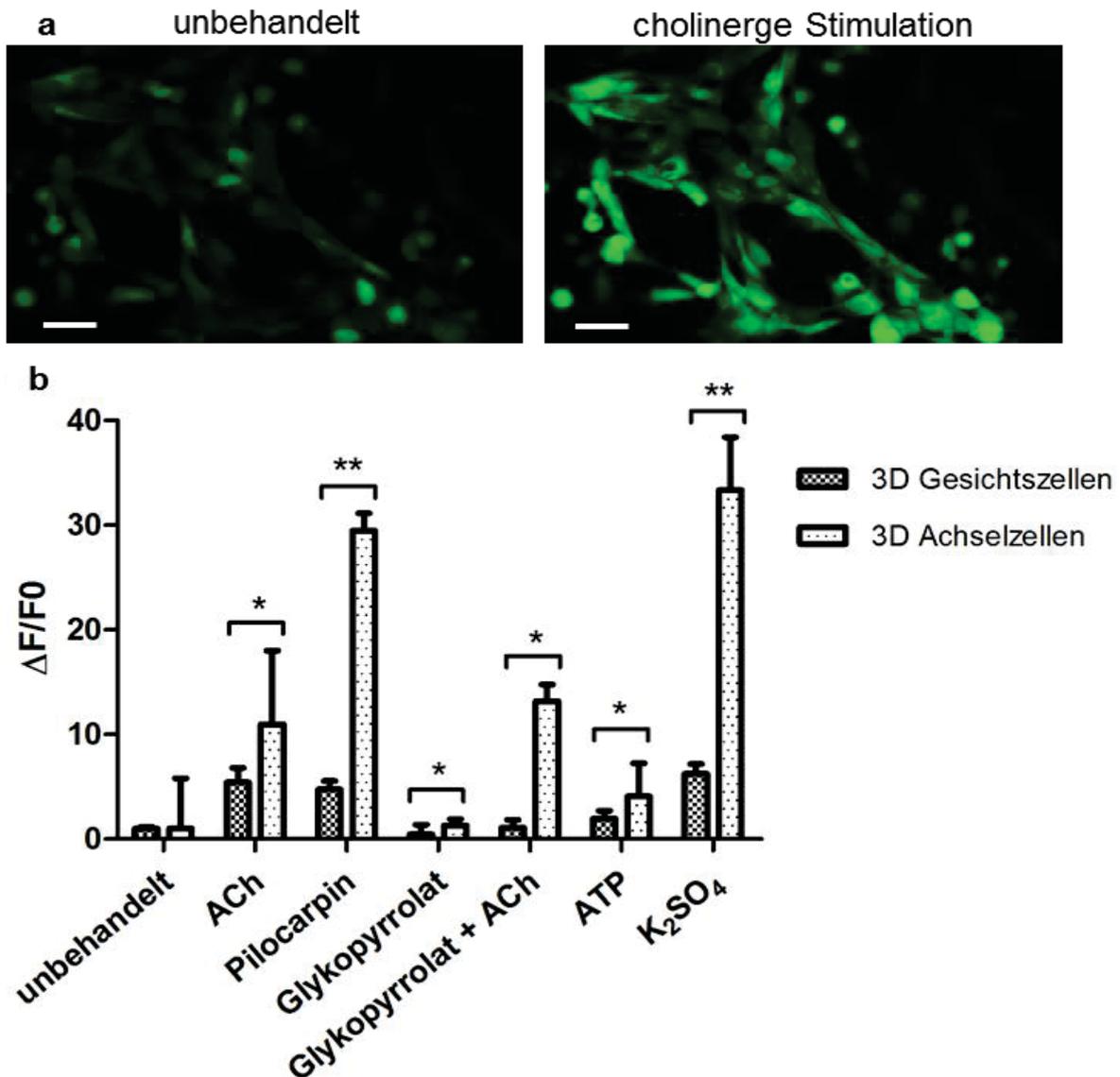
Mithilfe des Calcium Flux Assays wurde als *proof-of-concept* das physiologische Reaktionsvermögen der ekkrinen Schweißdrüsenzellen *in vitro* an der 2D Co-Kultur

und an 3D Co-Kultur Modellen mithilfe von Agonisten und Antagonisten analysiert (Abb. 33).

Zunächst wurde das Reaktionsvermögen der 2D Co-Kultur mithilfe des muskarinen Rezeptor-Agonisten Carbachol untersucht. Die ekkrine Schweißdrüsen-Zelllinie NCL-SG3 besitzt nicht mehr die physiologische Funktionsfähigkeit, auf einen cholinergen und  $\alpha$ -adrenergen Stimulus zu reagieren (Lee & Dessi, 1989). Aufgrund dessen wurde diese essentielle Funktion im Calcium Flux Assay ebenfalls in der 2D Kultur analysiert. Nach Zugabe von Carbachol, das spezifisch an muskarine und nikotinische ACh-Rezeptoren bindet, konnte ein erheblicher Anstieg der Fluoreszenz und damit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels gezeigt werden (Abb. 33a).

In einer weiterführenden Analyse wurde die Stimulation und die Inhibition in 3D Co-Kultur Modellen untersucht (Abb. 33b). Die Zellen stammten dabei entweder aus isolierten Drüsen der Gesichtsregion oder der Achselregion (Oberarminnenseite). Sie wurden nach der Isolation kultiviert. Anschließend wurden 3D Co-Kultur Modelle hergestellt. Mithilfe dieser Analyse sollte ein Einblick in das gewebespezifische und -abhängige Reaktionsvermögen von ekkrinen Schweißdrüsenzellen gewonnen werden. In Abb. 33b ist die relative Änderung der intrazellulären Fluoreszenz von Fluo-4 ( $\Delta F/F_0$ ) dargestellt, was die erhöhte Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an den Indikator und somit das erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Level im Vergleich zum unbehandelten Zustand widerspiegelt. Die Agonisten ACh und Pilocarpin binden spezifisch an muskarine ACh-Rezeptoren (siehe Tab. 12) und bewirken auf diese Weise den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ . Dies konnte nach Zugabe von ACh und Pilocarpin als starker Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels in den 3D Co-Kultur Modellen beobachtet werden (Abb. 33b). Jedoch wurde hier ein gewebespezifischer Unterschied festgestellt. 3D Co-Kultur Modelle aus Achselschweißdrüsenzellen zeigten eine wesentlich stärkere Reaktion nach Behandlung mit den Agonisten ACh und Pilocarpin. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt war in diesem Fall in 3D Co-Kultur Modellen mit kultivierten Schweißdrüsenzellen aus der Achselregion signifikant höher.

Mit dem muskarinen Antagonisten Glykopyrrolat wurde der inhibitorische Effekt im Calcium Flux Assay untersucht. Dabei zeigte der Inhibitor Glykopyrrolat alleine kaum bzw. keine Wirkung auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Level.



**Abbildung 33: Intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in der 2D Co-Kultur und in 3D Co-Kultur Modellen.** a) 2D Co-Kultur wurde mit dem muskarinen Agonisten Carbachol (200 nM) stimuliert, was zum Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels führte. Maßstab entspricht 50  $\mu\text{m}$ . b) Analyse der cholinergen Stimulation mit muskarinen Agonisten (ACh, Pilocarpin) sowie der purinergen Stimulation mit ATP in 3D Co-Kultur Modellen, die aus Schweißdrüsenzellen isolierter Drüsen der Achsel bzw. des Gesichts stammen. Stimulierende Reagenzien bewirkten den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in das Zytoplasma. Der muskarine Antagonist Glykopyrrolat bewirkte die Inhibition nur in 3D Co-Kultur Modellen aus Schweißdrüsenzellen des Gesichts. Die Inhibition konnte in 3D Modellen (Gesichtszellen) durch cholinerge Stimulation mit ACh nicht aufgehoben werden. Hingegen kam es in 3D Modellen aus Achselzellen nach Inhibition zur Stimulation. Student's t-Test  $n=6 \pm \text{SEM}$  mit  $p < 0,05$  (\*)  $< 0,01$  (\*\*).

Aufgrund dessen wurde die Inhibition mit anschließender Stimulation mit dem Agonisten ACh in den 3D Co-Kultur Modellen analysiert. Dabei konnte die Inhibition teilweise wieder aufgehoben werden. In 3D Co-Kultur Modellen aus Gesichtsschweißdrüsenzellen blieb die Inhibition allerdings nach anschließender Stimulation bestehen, da keine Fluoreszenzänderung beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Inhibition nach Zugabe von ACh in 3D Co-Kultur Modellen aus Achselschweißdrüsenzellen wieder aufgehoben und stieg nach Zugabe von ACh auf das Maximum an.

Nach purinergem Stimulation kommt es durch ATP zum Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels, welches in 3D Co-Kultur Modellen aus Achselschweißdrüsenzellen signifikant höher vorlag.

Zudem wurde der Einfluss von Ionenlösungen auf den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in 3D Co-Kultur Modellen analysiert. Die extrazelluläre Zugabe von Kaliumsulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) führte dabei zum Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels. Ein sehr signifikanter Anstieg wurde in 3D Co-Kultur Modellen aus Achselschweißdrüsenzellen im Vergleich zu 3D Co-Kultur Modellen aus Schweißdrüsenzellen der Gesichtsregion beobachtet.

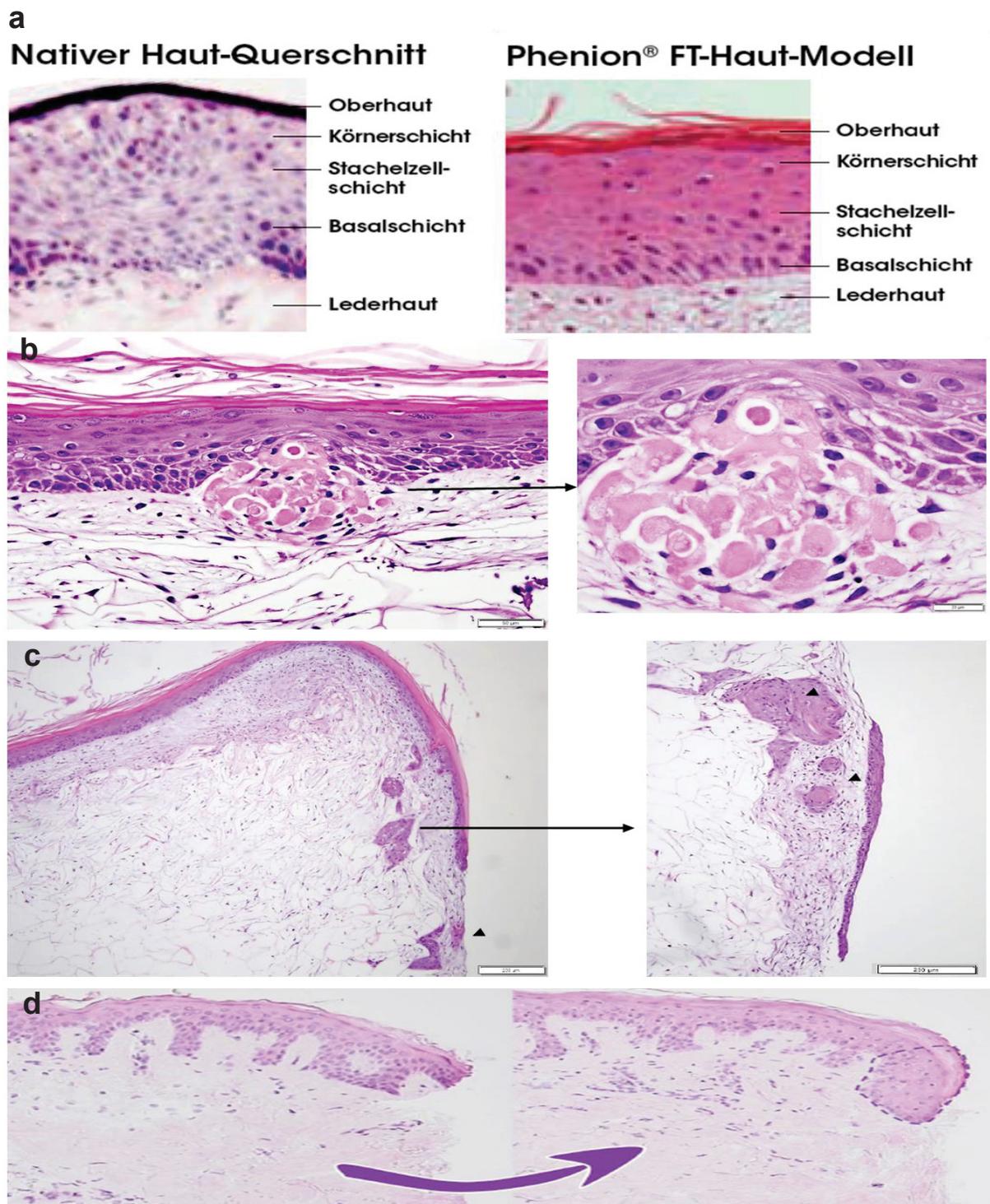
### 3.4 Integration von 3D Co-Kultur Modellen in ein Phenion-Vollhautmodell

Nach detaillierter Charakterisierung der 3D Modelle der Schweißdrüse (Co-Kultur, Coil, Dukt) wurden abschließend die 3D Co-Kultur Modelle in ein Phenion-Vollhautmodell integriert. Bisher wurde noch kein *in vitro* Vollhautmodell mit Hautanhangsgebilden, z.B. Schweißdrüsen oder Haarfollikel, entwickelt (Brohem *et al.*, 2011). Die verfügbaren rekonstruierten *in vitro* 3D Vollhautmodelle besitzen epidermale und/oder dermale Hautstrukturen und werden mit synthetischen Matrices hergestellt (Abb. 34a) (Ackermann *et al.*, 2010; Bellas *et al.*, 2012; Diekmann *et al.*, 2016; Welss *et al.*, 2004). Jedoch fehlen dem Hautäquivalent die Hautanhangsgebilde, die entscheidende Funktionen innehaben, wie die Aufrechterhaltung der Homöostase, die Immunabwehr und die Wundheilung (Nagel *et al.*, 2013; Schitteck *et al.*, 2001; Watabe *et al.*, 2013).

So wurden 3D Co-Kultur Modelle der ekkrinen Schweißdrüse in hoher Anzahl in die Dermis des Phenion-Vollhautmodells integriert (siehe 2.2.8). Zur Rekonstruktion der *in vivo* Situation wurden die Sphären in die Dermis, somit in die Schicht der ECM und der Fibroblastenzellen des Bindegewebes, eingesät. Dies entspricht dem physiologischen, nativen Zustand der Haut (Abb. 34a).

Nach Einsaat und Kultivierung der 3D Co-Kultur Modelle im Phenion-Vollhautmodell zeigte sich, dass sich der Aufbau und die Architektur der 3D Modelle nicht veränderte (Abb. 34b). Im oberen Bereich des 3D Modells konnte man jedoch z.T. ineinander übergehende Zellen der unteren Zellschicht der Epidermis, der Basalschicht, und des 3D Modells erkennen. Im Randbereich des Vollhautmodells wurden erneut 3D Modelle detektiert, die teilweise verklumpten und eine neue Schicht der Epidermis bildeten (Abb. 34c). Dies ist im *Human Skin punch model* des Fraunhofer Instituts (Kruse *et al.*), welches auf der Basis der Vorarbeiten von Lu *et al.* beruht (Lu *et al.*, 2007), ebenfalls der Fall. Nach Verletzung von humaner Haut durch Stanzen (sog. „*punch-in-a-punch*“) kommt es zur Neubildung der oberen Hautschicht, der Epidermis (Abb. 34d). Nach der Integration der 3D Co-Kultur Modelle der ekkrinen Schweißdrüse in ein Phenion-Vollhautmodell wurde eine *in vitro* Methode zur Weiterentwicklung des Vollhautmodells etabliert. Dies ermöglichte die Integration von rekonstruierten Hautanhangsgebilden der ekkrinen Schweißdrüse in ein *in vitro* 3D Vollhautmodell, das bisher noch keine „Schweißdrüsen-Äquivalente“ aufwies. Jedoch bedarf es noch weiteren Analysen, um die Zelldifferenzierung und die Wundheilung, die

möglicherweise von den integrierten 3D Co-Kultur Modellen der Schweißdrüse hervorgeht, in diesen Modellen nachweisen zu können.



**Abbildung 34: Integration von 3D Co-Kultur Modellen in ein *in vitro* Phenion-Vollhautmodell.** a) HE-Färbung eines nativen Hautschnitts und eines *in vitro* Phenion-Vollhautmodells. Aufbau des Vollhautmodells mit Epidermis und Dermis. b+c) 3D Co-Kultur Modelle wurden in die Dermis eines Vollhautmodells integriert und unter der epidermalen Schicht sowie im Randbereich der Dermis nach HE-Färbung detektiert. Maßstab in (b) 50  $\mu\text{m}$  bzw. 20  $\mu\text{m}$ . Maßstab in (c) 200  $\mu\text{m}$ . d) Wundheilungsmodell *Human Skin punch model* (des Fraunhofer Instituts) mit regenerierter Epidermis nach dem Stanzen (Kruse *et al.*).

## 4 Diskussion

Die Zellkultur ermöglicht die *in vitro* Kultivierung von Zellen eines Gewebetyps außerhalb des Organismus. Dabei werden in der Forschung entweder 2D oder auch 3D Zellkulturmodelle eingesetzt. Das Ziel dieser Arbeit war, ein *in vitro* 3D Modell der humanen ekkrinen Schweißdrüse zu etablieren und anhand spezifischer Marker zu charakterisieren. Dazu wurden Primärzellen verwendet, die aus nativem Gewebe stammen. Die Arbeiten zur effizienten Isolation von ekkrinen Schweißdrüsen aus Humanhaut sowie die Wahl eines geeigneten Kultivierungsmediums etc. erfolgten bereits in meiner Masterarbeit, sodass die Identifikation dieser Parameter nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit war. Die Primärzellen haben im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien den Vorteil, dass wichtige Marker und Funktionen der Zellen in der Kultur beibehalten werden, welche in Zelllinien genetisch und phänotypisch häufig verändert vorliegen (Bielecka *et al.*, 2016). Insgesamt sind Zellen in der konventionellen 2D Kultur dennoch Bedingungen und einer Umwelt ausgesetzt, die nicht mit der in einem Gewebe und damit nicht mit der *in vivo* Situation übereinstimmen (Desroches *et al.*, 2012). Die 2D Kultur ist aufgrund fehlender Zell-Zell-Interaktionen, Verlust von ECM-Kontakt und stark verändertem Signalling in ihrer Struktur sowie in ihrer Physiologie beschränkt, sodass Funktionsverluste in der 2D Kultur auftreten (Frey *et al.*, 2014).

In einem 3D Modell hingegen können einige Funktionen eines Gewebes oder eines Organs rekapituliert werden (Frey *et al.*, 2014; Huch & Koo, 2015; Shamir & Ewald, 2014). Dabei existieren sowohl 3D Modelle, welche mit einem sog. *scaffold* (Träger-/Gerüstmaterial) hergestellt werden (Brayden & Cuthbert, 1990; Kleinman & Martin, 2005; Lei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013) als auch sog. *scaffold*-freie 3D Modelle (Bartosh *et al.*, 2010; Shamir & Ewald, 2014; Thoma *et al.*, 2013).

Die bisherigen *in vitro* Arbeiten an Schweißdrüsenzellen wurden an der Zelllinie NCL-SG3 durchgeführt, welche als 2D Zellkultur-Modellsystem verwendet wurde (Bovell *et al.*, 2008; Ertongur-Fauth *et al.*, 2014; Mork *et al.*, 1996; Ring & Mork, 1997; Ring *et al.*, 1995; Servetnyk & Roomans, 2007). Frühere Studien zeigten auch ein 3D Modell mithilfe ekkriner Schweißdrüsenzellen und einer extrazellulären Matrix namens Matrigel, welches als *scaffold* fungiert (Huang *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013). *Scaffold*-freie 3D Modelle der Schweißdrüse wurden jedoch noch nicht etabliert. Daher wurde die *scaffold*-freie *Hanging drop*-Technologie hier zur

Etablierung eines rekonstruierten organotypischen 3D Modells der ekkrinen Schweißdrüse eingesetzt. Ein solches 3D Modell könnte beispielsweise zur Erforschung von Erkrankungen der Schweißdrüse, wie der Hyperhidrose, oder auch zur Identifikation von neuen Antitranspirant-Wirkstoffen verwendet werden.

#### 4.1 Grundlegende Eigenschaften ekkriner Schweißdrüsenzellen

Zur Etablierung eines rekonstruierten 3D Modells der Schweißdrüse bedarf es der Identifikation grundlegender *in vitro* Eigenschaften der primären ekkrinen Schweißdrüsenzellen. Zunächst wurden native ekkrine Schweißdrüsen aus Humanhaut isoliert und in der 2D Kultur kultiviert, welche dann in das 3D Modell überführt wurden. Die 2D und 3D *in vitro* Zellkultursysteme konnten so miteinander verglichen werden. Dabei wurden grundlegende Eigenschaften der primären ekkrinen Schweißdrüsenzellen *in vitro* identifiziert. Neben dem Wachstumsverhalten, der Morphologie und dem transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) wurde auch die Histologie und die Viabilität der Schweißdrüsenzellen in der 2D Kultur und in den 3D Modellen untersucht. Diese zellspezifischen Charakteristika, die Voraussetzung für die Entwicklung eines funktionalen, organotypischen 3D Modells der ekkrinen Schweißdrüse sind, konnten bisher noch nicht an primären Schweißdrüsenzellen gezeigt werden.

Aus Humanhaut wurden ekkrine Schweißdrüsen isoliert und in ein Zellkulturgefäß überführt. Nach Adhäsion der *in situ* Drüse am Zellkulturboden wurde das Gewebe mit zunehmender Kultivierungsdauer kleiner und es bildete sich ein Zellrasen. So konnte die Migration von Zellen aus der nativen *in situ* Drüse untersucht werden. Die Migration von Epithelzellen im Gewebe spielt eine zentrale Rolle bei deren Entwicklung (Embryogenese), bei der Immunität und bei der Wundheilung (Theveneau & Mayor, 2013; Velez-delValle *et al.*, 2016). Biedermann *et al.* konnte aufzeigen, dass ekkrine Schweißdrüsenzellen generell die Fähigkeit besitzen, *in vivo* sowie *in vitro* zu migrieren und auf diese Weise die Epidermis zu regenerieren (Biedermann *et al.*, 2013; Biedermann *et al.*, 2010). In Wundheilungsprozessen zeigten insbesondere Zellen aus dem Coil, aber auch aus dem Dukt, solche Migrationsfähigkeiten (Pontiggia *et al.*, 2014). Bei der Migration und Proliferation spielen außerdem bestimmte extrazelluläre Signale und Interaktionen zwischen Zellen eine entscheidende Rolle (Martin, 1997). Mithilfe der Zeitrafferaufnahmen konnte die Entstehung einer ädherent migrierenden

und proliferativen Zellpopulation aus der nativen Schweißdrüse nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse bleiben jedoch größtenteils unverstanden und müssen im Bezug zum Migrationsverhalten und zur Wundheilung, beispielsweise in einem „Migrationsassay“, mit ekkrinen Schweißdrüsenzellen durchgeführt werden (Velez-delValle *et al.*, 2016).

Im Allgemeinen gehören Schweißdrüsen zu Epithelgeweben. Dabei bilden Epithelzellen ein Deck- oder ein Drüsengewebe aus, welches eine apikal-basale Polarität mit Lumen sowie eine Basalmembran aufweist und eine Barriere bildet (Li *et al.*, 2015; Salas *et al.*, 2016). Die Barriere der ekkrinen Schweißdrüsenzellen wurde anhand des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) analysiert. Der TEER-Wert liefert gewebe- und zellspezifische Informationen über die Zell-Zell-Verbindungen, wie die sog. *Tight Junctions*, und über die Permeabilität eines Gewebes. Darüber hinaus können Rückschlüsse über den aktiven Austausch von Stoffen über die Barriere zwischen dem apikalen und dem luminalen Kompartiment geschlossen werden (Benson *et al.*, 2013; Srinivasan *et al.*, 2015). Der Austausch wird entweder transzellulär über aktive Transportprozesse oder parazellulär über *Tight Junctions* gewährleistet (Benson *et al.*, 2013). Bei der Messung mittels des „cellZscopes“ der Firma NanoAnalytics wurden zwei Messgrößen bestimmt. Die elektrische Membrankapazität  $C_{cl}$  sollte bei einem konfluenten Zellrasen bei  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  liegen, da die Lipiddoppelschicht der Zellen stets identisch aufgebaut ist. In primären Schweißdrüsenzellen der 2D Co-Kultur (mit Coil- und Dukt-Zellen) wurde ein TEER-Wert von ca.  $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erreicht, in der 2D Coil-Kultur hingegen nur ca.  $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und in der 2D Dukt-Kultur ca.  $5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Abb. 9). Dies verdeutlicht, dass Schweißdrüsenzellen in der 2D Co-Kultur eine weniger permeable, dichtere Barriere aufweisen als die separiert voneinander kultivierten 2D Coil- bzw. 2D Dukt-Zellen. Im Vergleich erzielten Brayden *et al.* ähnliche Ergebnisse bei primären Schweißdrüsenzellen. Auf Kollagen kultivierte Schweißdrüsenzellen zeigten einen TEER von ca.  $34 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , auf Matrigel kultivierte einen TEER von ca.  $85 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Brayden *et al.*, 1988). *Ex vivo* wurde im Dukt ein Widerstand von ca.  $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$  erzielt (Bijman & Fromter, 1986), was ungefähr mit den Dukt-Zellen der 2D Kultur übereinstimmt. Es ist bekannt, dass der TEER-Wert in der Zellkultur jedoch von vielen Größen abhängig ist. Dabei spielt der Aufbau der Elektroden, das verwendete Medium, die Art der Zellen (Primärzellen, Zelllinie), die Passage der Zellen etc. eine entscheidende Rolle, sodass die Messergebnisse dadurch stark beeinflusst werden (Srinivasan *et al.*, 2015).

Nichtsdestotrotz weisen niedrige TEER-Werte ( $< 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), die besonders bei Epithelien mit der Funktion des Flüssigkeits- und Elektrolyttransports vorkommen, auf eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellen und eine geringere Barrierefunktion hin (Saint-Criq & Gray, 2017). Indes werden Zellen mit geringen TEER-Werten als besonders variabel in ihrer Permeabilität angesehen (Benson *et al.*, 2013), was in ekkrinen Schweißdrüsenzellen ebenfalls der Fall sein könnte. Außerdem ist der TEER ein Indiz für den parazellulären Transport via *Tight Junctions*. Der parazelluläre Transport deutet auf den selektiven Stofftransport und auf den Wasserstrom im Epithel hin, welcher im Interzellularraum zwischen dem apikalen und dem luminalen Kompartiment verläuft. Dieser Transportprozess trägt zur Homöostase bei (Srinivasan *et al.*, 2015). Insgesamt sind dies bedeutsame Aspekte der epithelialen Sekretion, die auch im Zusammenhang mit der Schweißsekretion stehen. Bei der Sekretion von Schweiß kann die Sekretionsrate auf bis zu 4 l/h erheblich ansteigen (Hurley, 2001). Zudem werden die Substanzen im gebildeten Primärschweiß größtenteils im Dukt resorbiert, sodass der finale Schweiß aus 98-99% Wasser besteht (Draelos, 2001). Daher muss eine hohe, aber variable Permeabilität in und zwischen den Zellen der ekkrinen Schweißdrüse gewährleistet werden, die möglicherweise hier auch in der *in vitro* Kultur identifiziert wurde.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Schweißdrüsenzellen hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Die Zellen der 2D Co-Kultur und der 2D Coil-Zellen wiesen die charakteristische Pflasterstein-Morphologie auf (Gao *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2008). Demgegenüber zeigten Dukt-Zellen in der 2D Kultur in der Regel eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Struktur mit vereinzelt, großen Pflasterstein-artigen Zellen auf. Die spindelförmige, fädige Struktur ähnelte der Morphologie der Zellen, die in Arbeiten von Nagel *et al.* gezeigt wurden (Nagel *et al.*, 2013). Sie wurden in dieser Studie als Nestin-positive Stammzellen der Schweißdrüse und als Schweißdrüsen-abgeleitete Stammzellen des Mesenchyms bezeichnet. Alleine die Morphologie konnte an dieser Stelle jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf die multipotenten Eigenschaften der Dukt-Zellen geben.

Nach der 3D Kultivierung mittels *Hanging drop*-Verfahren wurden ebenfalls unterschiedliche Morphologien der Zellen in den 3D Modellen (3D Co-Kultur, 3D Coil, 3D Dukt) nachgewiesen. Die Schweißdrüsenzellen assemblierten selbständig (sog. *self-assembly*) zu runden Sphären (*microtissues*), was beispielsweise auch bei

Herzmuskel-, Herzfibroblasten-, Mesenchymzellen oder embryonalen Stammzellen beobachtet wurde (Bartosh *et al.*, 2010; Beauchamp *et al.*, 2015; Desroches *et al.*, 2012; Samuelson & Metzger, 2006). Das 3D Co-Kultur Modell und das 3D Coil-Modell wiesen fransige Strukturen im Randbereich auf (Abb. 10). Diese könnten für proliferierende Zellen sprechen, die in 3D Modellen besonders basolateral zu finden sind (Thoma *et al.*, 2014). Dagegen konnten 3D Dukt-Modelle eine abgrenzende äußere Membran aufweisen, die möglicherweise eine Basalmembran darstellt. Dies wurde von Li *et al.* für Schweißdrüsenzellen beschrieben, die 3D in Matrigel kultiviert wurden (Li *et al.*, 2015).

Im Vergleich zu 3D Co-Kultur Modellen besaßen 3D Dukt- und 3D Coil-Modelle eine stark verringerte Sphärengröße von ca. 250-700 µm, die im 3D Co-Kultur Modell auf bis zu ca. 1000 µm anstieg. Das Wachstumsverhalten der 3D Modelle wurde hier auch im Bezug zur Zellzahl und zur Kultivierungsdauer analysiert. Es konnte keine Zunahme und kein Wachstum anhand der Bestimmung des Sphärendurchmessers in den 3D Modellen beobachtet werden. Die Größe der Sphären hing zwar von der Zellzahl bei Einsaat ab, jedoch war diese nicht linear, da z.B. mit der Verdopplung der Zellzahl der Sphärendurchmesser nicht um das 2x anstieg. Mit fortlaufender Kultivierungsdauer wurde eine tendenzielle Abnahme der Sphärendurchmesser nachgewiesen, insbesondere bei > 50.000 Zellen/pro Kultur (Abb. 11a+b). Weiterhin wurde ein Phänomen in den drei Formen der 3D Modelle (Co-Kultur, Coil, Dukt) unabhängig von der Zellzahl beobachtet: Zunächst zeigten die 3D Modelle eine leichte Größenzunahme, meist gefolgt von der Abnahme des Durchmessers, was für einen kompakten Zellverband spricht. Möglicherweise könnte dies auf eine Abfolge von Proliferation, Dissoziation und Re-Aggregation hindeuten (Kim *et al.*, 2013). Außerdem war die Größe der Sphäre äußerst geringen Schwankungen ausgesetzt. Dies spricht zudem für ein kontrolliertes Mikromilieu sowie eine hohe Reproduzierbarkeit der Zellkulturen und konnte nicht für jeden Zelltyp erreicht werden (Chan *et al.*, 2013).

Im nächsten Schritt wurde die Histologie im 3D Modell untersucht. Es wurden Paraffinschnitte der 3D Modelle (Co-Kultur, Coil, Dukt) hergestellt und nach der histologischen HE- und Azan-Färbung lichtmikroskopisch analysiert. Die histologischen Schnitte sollten insbesondere Aufschluss über die Gewebestruktur innerhalb der Sphären liefern. In der HE-Färbung werden Zellkerne, die saure bzw. basophile Strukturen darstellen, durch das Anfärben mit Hämatoxylin blauviolett

gefärbt (Mulisch & Welsch, 2010). Basische bzw. acidophile Strukturen, wie Zellplasmaproteine und Kollagenfasern, werden durch den Farbstoff Eosin dagegen hellrot/lila gefärbt. Dies konnte ebenfalls in den 3D Modellen gezeigt werden, da hier Zellkerne blauviolett und Zytoplasma heller gefärbt wurden. So konnten Zellkerne und Zytoplasma gut voneinander unterschieden werden. In Abb. 3b wurde ein nativer Kryohautschnitt mit ekkriner Schweißdrüse HE-gefärbt. Hier erkennt man die intensivere Violettfärbung des Dukt-Kompartiments im Vergleich zum sezernierenden Coil. Auch die HE-Färbung der 3D Modelle unterschied sich je nach Ausführungsform des Modells (Co-Kultur, Coil, Dukt). Das 3D Co-Kultur Modell wurde im Gegensatz zum 3D Coil-Modell relativ einheitlich violett gefärbt. Innerhalb des 3D Coil-Modells traten unterschiedliche Schichten zum Vorschein. Das 3D Dukt-Modell wurde nicht wesentlich dunkler gefärbt und besaß eine hohe Anzahl kleiner Zellen im Zentrum, was für eine kompaktere Struktur oder Kolonien-bildende Zellen mit besonders kleiner Größe spricht (Velez-delValle *et al.*, 2016). Da die Gewebestrukturen der 3D Modelle mittels HE-Färbung nicht eindeutig identifiziert werden, wurde zur Differenzierung von Bindegewebe und anderen Zellbestandteilen die Azan-Färbung eingesetzt (Mulisch & Welsch, 2010).

Das 3D Co-Kultur Modell wurde sehr hell gefärbt, was bei Zytoplasma, elastischen Membranen und Epithelien in der Azan-Färbung ebenfalls der Fall ist (Jastrow, 2014). Auch die native Drüse wurde in der Azan-Färbung ähnlich hell gefärbt (Abb. 3a). Im 3D Coil-Modell wurden hingegen wie in der HE-Färbung mehrere Schichten mit unterschiedlichen Farbtintensitäten nachgewiesen. Insbesondere fällt dabei die tiefrote Färbung im Zentrum des 3D Coil-Modells auf. Eine solche Farbgebung wurde in der Azan-Färbung auch von Diekmann *et al.* in 3D Vollhautmodellen beobachtet, welche einzelne Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) in der dermalen Schicht des Vollhautmodells nachwies (Diekmann *et al.*, 2016). Die ECM hat dabei besondere Bedeutung bei der Migration und bei der Differenzierung der Zellen in einem 3D Modell (Chan *et al.*, 2013). Somit waren manche Zellen im 3D Coil-Modell möglicherweise in der Lage, Komponenten der Matrix im Inneren der Sphäre zu generieren.

In der Azan-Färbung werden Kollagenfasern (Typ I) der ECM sowie Mucus intensiv blau gefärbt (Fukada *et al.*, 2014; van Griensven *et al.*, 2002). In 3D Dukt-Modellen wurde ebenfalls eine Blaufärbung detektiert, was auf die Bildung von Kollagen zum Strukturerehalt oder sezernierten Mucus hindeutet. Desroches *et al.* zeigte im *scaffold-*

freien 3D Modell aus Herzmuskel- und Herzfibroblasten-Zellen die endogene Bildung von ECM und wies die Komponenten Laminin, Fibronectin sowie Prokollagen I mittels Western Blot-Analyse eindeutig nach. Die Bildung dieser Komponenten im 3D Modell wurde insbesondere auf die Zell-Zell-Interaktionen zurückgeführt. Die Zellen erzeugten dabei ihr spezifisches Milieu inklusive ECM (Desroches *et al.*, 2012). Dies ist auch in den 3D Modellen der Schweißdrüse denkbar. Die Blaufärbung könnte auch auf Mucus hindeuten. Mucus wird von vielen Epithelzellen, wie Drüsengewebe, in Kombination mit Flüssigkeit sezerniert. Er setzt sich aus Mucinen und inorganischen Salzen zusammen (Quinton, 2010). Dabei stellt Mucin ein Glykoprotein dar, welches auch in Schweißdrüsen exprimiert und sezerniert wird (Ando *et al.*, 1998). Die blaugefärbten Strukturen im 3D Dukt-Modell könnten somit auf die sekretorische Aktivität der Zellen hinweisen. Zur Unterscheidung von Kollagenfasern und Mucus bedarf es jedoch weiterer Analysen.

Die Viabilität und Vitalität spielt in 3D Modellen eine entscheidende Rolle, da es hauptsächlich in sphäroiden Konstrukten zu Nekrose und/oder Apoptose kommen kann, beispielsweise durch Unterversorgung. Die Unterversorgung kann dabei durch den Mangel von Nährstoffen, Sauerstoff und/oder die Ansammlung von Abbauprodukten hervorgerufen werden. Unabhängig vom Zelltyp sind 3D Modelle mit einer gewissen Größe (von ca. > 200  $\mu\text{m}$ ) meist von erhöhtem Zelltod betroffen (Frey *et al.*, 2014; Zanoni *et al.*, 2016). Ein 3D Modell mit einem erhöhten Durchmesser kann jedoch auch eine geringe Zelltodrate aufweisen, wenn es eher durchlässig organisiert ist (Thoma *et al.*, 2014). Die Viabilität beschreibt die Lebensfähigkeit einer Zelle, welche eine intakte Zellmembran besitzt. Die Vitalität hingegen weist Zellen mit intrazellulärer Stoffwechselaktivität nach. Zum Nachweis der Viabilität und Vitalität wurde der Farbstoff Calcein AM verwendet, welcher in der Zelle aktiv zu Calcein umgesetzt wird und stoffwechselaktive Zellen nachweist. Mit dem Farbstoff EthD-1 werden tote Zellen mit einer defekten Membran aufgezeigt, sodass hier tote und vitale Zellen voneinander unterschieden werden können. Diese Unterscheidung wurde mittels des Live-Dead Assays in 3D Modellen durchgeführt (Abb. 14-16). Bei der Analyse der Lebend-Tot-Doppelfärbung wurde der Einfluss des Zelltyps, der Kultivierungsdauer und der Zellzahl im 3D Modell untersucht. In 3D Co-Kultur Modellen wurde ein starker Anstieg der Zelltodrate von D3 nach D7 unabhängig von der Zellzahl nachgewiesen. Insbesondere wiesen Zellen, welche sich basolateral im 3D Co-Kultur Modell befanden, eine starke Grün-Färbung, d.h. eine hohe Vitalität, auf. Jedoch

wiesen 3D Coil-Modelle und 3D Dukt-Modelle optisch eine intensivere Grün-Färbung auf. Dies könnte auf den geringeren Sphärendurchmesser der 3D Coil-Modelle und der 3D Dukt-Modelle zurückgeführt werden. Ein nekrotisches Zentrum, wie es vermehrt in der Literatur beschrieben wurde (Thoma *et al.*, 2014; Zanoni *et al.*, 2016), konnte nur in 3D Coil-Modellen bei einer Zellzahl von > 50.000 Zellen/Kultur gezeigt werden. Suboptimale Kulturbedingungen führen in 3D Modellen auch zur Quieszenz (Ruhe-/Inaktivitätsphase) und anschließend zur Apoptose von Zellen (Thoma *et al.*, 2014). Die Zellen in der Ruhephase sind zwar intakt, aber sind nicht stoffwechselaktiv. Aus diesem Grund wurden diese Zellen im 3D Modell vermutlich weder grün noch rot gefärbt und insbesondere im Inneren des Modells nachgewiesen. Diese quieszenten und apoptotischen Zellen können nach Zanoni *et al.* in das Innere der Sphäre migrieren (Zanoni *et al.*, 2016), sodass es zur Ausbildung eines nekrotischen Zentrums kommt. Thoma *et al.* zeigte, dass ein durchlässig organisiertes Sphäroid mit erhöhtem Durchmesser nicht unbedingt ein solch nekrotisches Zentrum ausbildet (Thoma *et al.*, 2014). Möglicherweise weisen die Schweißdrüsenzellen auch im 3D Modell eine hohe Durchlässigkeit auf, sodass es nicht zur Nekrose und Apoptose im Zentrum des 3D Modells kommt. Dies würde auch mit den Daten der TEER-Messung übereinstimmen, die permeable Schweißdrüsenzellen zeigten. In einer Studie von Bartosh *et al.* wurden humane Mesenchymzellen im *Hanging drop* kultiviert und ebenfalls auf ihre Viabilität und Vitalität analysiert. Dabei wurde eine optimierte Kultivierungszeit von D3 und eine Zellzahl von bis zu 100.000 Zellen/Kultur bestimmt (Bartosh *et al.*, 2010). Dies entspricht den Erkenntnissen der Viabilitäts-Analyse in den 3D Modellen der Schweißdrüse. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für die weiteren Untersuchungen eine Zellzahl von 25.000 Zellen/Kultur und eine Kultivierungszeit von D3 verwendet. Im nächsten Schritt wurde die Differenzierung und die Polarität der 3D Modelle mithilfe spezifischer Marker der ekkrinen Schweißdrüse analysiert.

#### **4.2 Charakterisierung des rekonstruierten 3D Modells im Vergleich zur 2D Kultur sowie zur nativen Drüse**

Mithilfe der *Hanging drop*-Technologie konnten rekonstruierte 3D Modelle der ekkrinen Schweißdrüse entwickelt werden. Nach der Identifikation von grundlegenden *in vitro* Eigenschaften der Schweißdrüsenzellen wurden die 3D Modelle anhand bekannter Schweißdrüsen-spezifischer Marker auf Ebene der Genexpression sowie auf Ebene

der Proteinexpression charakterisiert. Des Weiteren wurden die 3D Modelle auf ihre Differenzierung sowie ihre Polarität untersucht.

#### 4.2.1 Nachweis spezifischer Marker mittels Genexpressionsanalyse

In der Genexpressionsanalyse wurden die Marker CHRM3, AQP5, CEACAM5, PIP, NKCC1 sowie ANO1 im 3D Modell mittels qRT-PCR untersucht. Die Auswahl dieser Marker, die insbesondere Rezeptoren, Differenzierungsmarker, Regulatoren oder Ionenkanäle/-transporter darstellen, orientierte sich an deren entscheidenden Funktionen bei der Schweißsekretion (Bovell, 2015; Cui & Schlessinger, 2015; Sugiura *et al.*, 2015). Im Vergleich zur 2D Kultur wurden in 3D Modellen insgesamt induzierte Genexpressionen der zuvor genannten Marker gezeigt. In der 2D Kultur wurden die Marker CHRM3 und AQP5 nicht exprimiert, was auf einen Funktionsverlust beim Schwitzmechanismus hindeutet. CHRM3 ist in ekkrinen Schweißdrüsen essentiell für die cholinerge Signalweiterleitung (Kurzen *et al.*, 2004; Landis, 1999) und AQP5 für den Wassertransport (Ishikawa & Ishida, 2000). Dieser Vergleich zwischen 2D Kultur und 3D Modell spricht für die Induktion der Genexpression durch die 3D Kultivierungsmethode (Samuelson & Metzger, 2006). CHRM3 und AQP5 wurden insbesondere in 3D Co-Kultur Modellen exprimiert, wohingegen CHRM3 in 3D Dukt-Modellen stark reduziert und AQP5 nicht exprimiert wurde. Sowohl CHRM3 als auch AQP5 stellen spezifische Marker des Coils dar (Cui & Schlessinger, 2015), was die geringen Expressionen im 3D Dukt-Modell erklären könnte. CHRM3 und AQP5 wurden an D7 im 3D Co-Kultur Modell induziert exprimiert. PIP wurde an D3 höher exprimiert, welches *in vivo* an AQP5 bindet und die Wassersekretion bewirkt (Nejsum *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 2015). Li *et al.* berichteten, dass Schweißdrüsenzellen nach kurzer Kultivierungszeit von der Proliferation in die Differenzierung übergehen, welche in Matrigel dreidimensional kultiviert wurden (Li *et al.*, 2017). Dieser Annahme folgend, könnten die hier festgestellten, zeitlich unterschiedlichen Genexpressionen der analysierten Marker auf Prozesse der Proliferation oder der Differenzierung des 3D Modells hindeuten. Interessanterweise wurde die Genexpression von CEACAM5 bereits nach 3 Tagen in Kultur im Vergleich zu CHRM3 oder AQP5 erst nach 7 Tagen induziert. Außerdem wiesen 3D Co-Kultur Modelle vergleichbare CEACAM5-Transkriptmengen zur nativen *in vivo* Drüse auf. Dies deutet auf stark differenzierte und polarisierte Schweißdrüsenzellen im 3D Co-Kultur Modell hin, wie es von Ilantzis *et al.* für Darmzellen in 3D Kulturen gezeigt wurde (Ilantzis *et al.*, 2002).

NKCC1, ein Natrium-Kalium-Chlorid Cotransporter, und ANO1, ein Cl<sup>-</sup>-Ionenkanal, konnten in der 2D Kultur und in 3D Modellen nachgewiesen werden. Dabei wird NKCC1 *in vivo* im sezernierenden Coil und schwach im Dukt (Cui & Schlessinger, 2015), dagegen ANO1 nur im Coil exprimiert (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014). Beide Marker wurden insgesamt geringer in der 2D Kultur detektiert. NKCC1 wurde besonders in der 2D Co-Kultur und im 3D Co-Kultur Modell exprimiert. Separierte Coil- und Dukt-Zellen wiesen – unabhängig von der 2D oder der 3D Kultivierungsmethode – eine sehr geringe NKCC1-Expression auf. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zelltypen der ekkrinen Schweißdrüse bei getrennter Kultivierung möglicherweise ihre Zellidentität verlieren und zur Aufrechterhaltung voneinander abhängig sind. Sato *et al.* konnte diesen Verlust *in vitro* ebenfalls nachweisen (Cui & Schlessinger, 2015; Sato *et al.*, 1989).

Demgegenüber war die Genexpression von ANO1 nicht vom Zelltyp (Co-Kultur, Coil-, Dukt-Zellen) oder der Art der Kultivierung (2D, 3D) abhängig; ANO1 wurde in der 2D Kultur und stärker in der 3D Kultur, aber insgesamt am höchsten in der 3D Co-Kultur und in 3D Coil-Modellen exprimiert. ANO1 als luminaler Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Chloridkanal ist neben CFTR für die Akkumulation von Cl<sup>-</sup> in das Coil-Lumen und somit für die Bildung des Primärschweißes verantwortlich (Concepcion & Feske, 2016; Concepcion *et al.*, 2016; Ertongur-Fauth *et al.*, 2014). In der einzig etablierten Zelllinie für ekkrine Schweißdrüsen (NCL-SG3) konnte die Genexpression von NKCC1 und ANO1 ebenfalls nachgewiesen werden, der entscheidende Rezeptor für die cholinerge Innervation (CHRM3) hingegen nicht. Die hier beobachtete ANO1-Genexpression könnte auf zwei Aspekte zurückzuführen sein: Erstens illustriert dies, dass in der 2D Kultur und in den 3D Modellen vorwiegend sezernierende Zellen des Coils vorliegen, was auch mit der Zelllinie NCL-SG3 übereinstimmt (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014). ANO1 wurde im 3D Dukt-Modell ebenfalls exprimiert (Abb. 17b), jedoch wird in der Literatur ANO1 als Marker des Coils beschrieben, welcher im Dukt nicht vorkommen soll (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014; Saint-Criq & Gray, 2017). Zweitens deutet dies möglicherweise auf eine Kontamination mit Coil-Zellen in der Dukt-Kultur hin, die eventuell aus der Transitionszone zwischen Coil und Dukt stammten und Charakteristika beider Zelltypen besaßen (Bovell, 2015).

Weiterhin wurde die Genexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker in 3D Co-Kultur Modellen untersucht, welche aus kultivierten Schweißdrüsenzellen von drei

unterschiedlichen Spendern hergestellt wurden. Es konnten leichte Schwankungen innerhalb der Spender in den Genexpressionen nachgewiesen werden. Papadimitropoulos *et al.* zeigten, dass in der 3D Kultur geringere interindividuelle Schwankungen im Vergleich zur 2D Kultur auftreten. Mit diesem Phänomen wurden hochregulierte Gene verschiedener Signalwege in den 3D Modellen in Verbindung gebracht, welche in der 2D Kultur nicht aktiviert sind (Papadimitropoulos *et al.*, 2014).

Im Rahmen dieser Expressionsanalysen wurde deutlich, dass Markergene, die mit dem Sekretionsprozess assoziiert sind, im zeitlichen Verlauf und je nach Art der Kultivierung (2D, 3D) differenziell reguliert werden. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so deuten diese auf eine Favorisierung der 3D *Hanging drop*-Kultivierung hin. Gene, die nativ exprimiert werden, gehen in 2D Kulturen teilweise verloren und werden im physiologischeren 3D Modell wieder exprimiert.

#### **4.2.2 Nachweis spezifischer Marker mittels Proteinexpression**

Mittels Proteinexpressionsanalysen wurde die Lokalisation unterschiedlicher Schweißdrüsen-spezifischer Marker im 3D Modell identifiziert. Diese wurden bereits in Studien von Biedermann *et al.* und anderen Arbeitsgruppen in der nativen Drüse und in Schweißdrüsenzellen lokalisiert. *In vivo* wurden die Marker CEACAM5 und NKCC1 sowohl im Coil- als auch im Dukt-Kompartiment beschrieben. Spezifisch für das Coil-Kompartiment waren CHRM3,  $\alpha$ -SMA, AQP5, ANO1, Substance P sowie CGRP und für das Dukt-Kompartiment CK10, Involucrin, CD200 sowie GalR2 (Biedermann *et al.*, 2010; Bovell *et al.*, 2013; Cui & Schlessinger, 2015; Lei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Saint-Criq & Gray, 2017; Zancanaro *et al.*, 1999).

Diese Marker wurden mittels Immunfluoreszenz in der nativen Drüse, in der *in situ* Drüse mit auswachsenden Zellen der 2D Co-Kultur und in 3D Modellen (Co-Kultur, Coil, Dukt) analysiert, sodass ein Vergleich der Proteinexpression von *in vivo*, *in situ* zu *in vitro* möglich war (Abb. 19+20). *In situ* Drüsen exprimierten alle ausgewählten Marker. Interessanterweise verlieren die Schweißdrüsenzellen im Laufe der Migration und Proliferation aus der nativen Drüse eine Vielzahl der analysierten Marker. Ein solches Phänomen der De-Differenzierung *in vitro* wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Cui & Schlessinger, 2015; Cuthbert *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1989). Diese Ergebnisse unterstützen demzufolge die Genexpressionsdaten, bei

denen ebenfalls ein Verlust bestimmter Genaktivitäten im zeitlichen Verlauf und je nach Art der Zellkultivierung gezeigt werden konnte.

Werden die in der 2D Kultur expandierten Zellen in eine „natürlichere“ Umgebung in ein 3D *Hanging drop*-Modell überführt, kommt es zur Induktion der Marker (Bartosh *et al.*, 2010; Bielecka *et al.*, 2016; Foty, 2011; Samuelson & Metzger, 2006). Dazu zählen die stark im 3D Co-Kultur Modell exprimierte Schweißdrüsen-spezifischen Marker CEACAM5, CHRM3, NKCC1, AQP5, ANO1,  $\alpha$ -SMA, TRPM8, und GalR2. Die Marker CK10, Involucrin, CD200 und S100 wurden in der nativen Drüse gering exprimiert und auch im 3D Modell nur schwach nachgewiesen. Diese schwach exprimierten Marker waren, bis auf S100, Dukt-Marker. Dies unterstützt die bereits aufgestellte Hypothese, dass im 3D Co-Kultur Modell vorwiegend Coil-Zellen und nur ein geringer Anteil Dukt-Zellen vorlagen. Auch dieses Ergebnis wird durch die Genexpressionsanalysen unterstützt. Brayden *et al.* führten durch das Anlegen einer elektrischen Spannung (*short circuit current*) Messungen zum epithelialen Ionenstrom durch (Brayden *et al.*, 1988). Sie konnten aufzeigen, dass primäre ekkrine Schweißdrüsenzellen des Coils in der 2D Kultur duktile Eigenschaften beim transzellulären Ionentransport annahmen. Dieser Prozess wird als Transformation oder als De-Differenzierung bezeichnet (Brayden *et al.*, 1988; Cuthbert *et al.*, 1990). Die Transformation der Zellen im 3D Co-Kultur Modell wäre auch hier denkbar, sodass möglicherweise Dukt-Zellen Eigenschaften von Coil-Zellen annahmen und ein Wandel der Zellidentität stattfand.

Die Marker NKCC1 und CEACAM5, die sowohl im Dukt als auch im Coil vorkommen, dienen der allgemeinen Identifikation von ekkrinen Schweißdrüsenzellen im 3D Modell. Weiterhin wurden die Marker CHRM3, AQP5, ANO1,  $\alpha$ -SMA, GalR2 und S100 zum Nachweis von Coil-Zellen verwendet, da diese Coil-spezifische Marker darstellen. In der Immunfluoreszenz wurden diese Marker besonders stark, hauptsächlich basolateral im 3D Co-Kultur Modell nachgewiesen. Folglich wurden spezifisch ekkrine Schweißdrüsenzellen und des Weiteren Zellen des sezernierenden Coils sowie ihre Position im 3D Co-Kultur Modell nachgewiesen. Außerdem bestätigte der Marker  $\alpha$ -SMA Myoepithelzellen, die das 3D Modell als Zellschicht umrandeten und deren Lokalisation ebenfalls dem nativen Coil entsprach. Diese sind für den Strukturerhalt und die Kontraktion bei der Sekretion verantwortlich (Saga, 2002; Sato *et al.*, 1991), was im 3D Modell ebenfalls vermutet werden könnte. Mithilfe der Marker CEACAM5 und AQP5 werden außerdem Polarität und Differenzierung in Verbindung gebracht

(Brown *et al.*, 1995; Ilantzis *et al.*, 2002; Nejsum *et al.*, 2002), sodass man hier von differenzierten, organisierten Zellen mit bestimmten funktionellen Identitäten sprechen könnte.

Ein weiterer Chloridkanal des Coils, ANO1, wurde sowohl in der nativen Drüse als auch im 3D Co-Kultur Modell stark luminal exprimiert. Die Lokalisation im 3D Modell stimmt hier überwiegend mit der *in vivo* Situation des gefärbten Humanhautschnittes überein. Ebenfalls dokumentierten Ertongur-Fauth *et al.* ANO1 *in vivo* in sezernierenden Coil-Zellen der ekkrinen Schweißdrüse (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014). Dieser befördert Cl<sup>-</sup>-Ionen zur Bildung eines elektrochemischen Gradienten in das Lumen des Coils (Saint-Criq & Gray, 2017). Daraus kann auf apikal-basale Polarität im 3D Co-Kultur Modell geschlossen werden. In Epithelgeweben ist diese Polarität für die Funktionalität der Zellen essentiell (Overeem *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu ist die Expression solcher funktionalen und strukturellen Polaritäts-Marker in epithelialen 3D Tumor-Modellen exzessiv und unorganisiert, sodass von Polaritätsverlust und Verlust der Physiologie ausgegangen wird (Ilantzis *et al.*, 2002; Nelson, 2009). Hier zeigte sich eine organisierte Verteilung dieses charakteristischen Ionenkanals im Zentrum des 3D Co-Kultur Modells, was auf luminal differenzierte Zellen hindeutet.

In der Proteinexpressionsanalyse wurde auch S100 als Marker eingesetzt, jedoch wurde dieser schwach basolateral in den 3D Modellen detektiert. Die Familie der Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteine hat eine Vielzahl regulatorischer Funktionen, wie beispielsweise die Enzymaktivierung oder die Sekretion, und wird in der ekkrinen Schweißdrüse exprimiert (Li; *et al.*, 2017; Wilke *et al.*, 2006; Zancanaro *et al.*, 1999). In der Literatur ist die Expression von S100-Proteinen in Zellen der Schweißdrüse nicht konsistent, da S100 teilweise in Myoepithelzellen gezeigt wurde (Wilke *et al.*, 2006) oder aber nur in *clear cells* detektiert wurde (Zancanaro *et al.*, 1999). Die S100-positiven Zellen im 3D Co-Kultur Modell deuten möglicherweise auf Myoepithelzellen hin, da sie als Zellschicht das 3D Modell umrandeten.

Bisher konnte GalR2 und TRPM8 noch nicht an *in vitro* Kulturen der Schweißdrüse gezeigt werden. GalR2 stellt einen transmembranen G-Protein gekoppelten Neuropeptid-Rezeptor dar, welcher Galanin bindet, und im zentralen sowie im peripheren Nervensystem weit verbreitet ist. Die GalR1-3 werden über unterschiedliche Signalwege gesteuert, die K<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionenkanäle beeinflussen. In der ekkrinen Schweißdrüse wird vermutet, dass durch die Bindung

von Galanin an GalR2 und GalR3 die Cl-Konzentration intrazellulär ansteigt und damit die Sekretion induziert wird (Bovell *et al.*, 2013). Im Hautschnitt wurde GalR2 nur im sezernierenden Coil und nicht im Dukt sowie stark basolateral im 3D Co-Kultur Modell exprimiert, sodass hier GalR2 eindeutig nachgewiesen wurde. Die Daten weisen erneut auf sezernierende Zellen im 3D Modell hin, die basolateral vermehrt der Funktion des Signalempfangs zugeordnet werden können.

TRPM8 wird auch als Kälte-/Menthol-Rezeptor bezeichnet. Vermutlich spielt der Menthol-Rezeptor eine wichtige Rolle in der epidermalen Homöostase und Hautbarriere. Er konnte auch in epidermalen Keratinozyten detektiert werden (Denda *et al.*, 2010). Außerdem ist er maßgeblich für das Kälteempfinden – und daher auch für die Thermoregulation – verantwortlich und wird bei Temperaturen  $< 26^{\circ}\text{C}$  aktiviert, was den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Zytoplasma bewirkt (Toth *et al.*, 2014). Der thermosensitive Ionenkanal wurde nativ in Schweißdrüsen exprimiert, jedoch nicht in der Zelllinie NCL-SG3 (Czifra *et al.*, 2012). In Vollhautschnitten wurde TRPM8 nativ stark im Coil, schwach im Dukt und auch stark im gesamten 3D Co-Kultur Modell detektiert. Die Zellen im 3D Modell lassen vermuten, dass neben der cholinergen Stimulation auch eine Stimulation über Modulatoren wie beispielsweise Galanin oder Menthol möglich sein könnte. Dies sollte in der Zukunft anhand des 3D Modells näher analysiert werden.

Um mögliche Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den unterschiedlichen 3D Modellen feststellen zu können, wurden auch 3D Coil- und 3D Dukt-Modelle auf ihre Proteinexpression analysiert (Abb. 21+22). Dabei wurden neben den bereits analysierten Schweißdrüsen-spezifischen Markern auch Marker der Subzelltypen (*clear cells*, *dark cells*, Myoepithelzellen, Stammzellen, proliferierende Zellen) untersucht. Die Marker CHRM3, ANO1, Substance P, S100 und CGRP markierten keine Zellen in 3D Dukt-Modellen. Dies entspricht jedoch der *in vivo* Situation, zumal diese Marker Coil-spezifisch sind. Im Vergleich zum 3D Co-Kultur Modell konnte in vielen Fällen eine verminderte Menge an Protein in 3D Coil-Modellen nachgewiesen werden. Des Weiteren entsprach die Lokalisation weniger der apikal-basalen Polarität. Insbesondere wurde dies in der ANO1-Immunfluoreszenz deutlich, da dieser Marker im 3D Coil-Modell nicht mehr apikal nachweisbar war. Wie bereits im Rahmen der Diskussion zur Genexpression erwähnt, stützt dieses Ergebnis die Hypothese, dass sich aufgrund der fehlenden Zell-Zell-Kommunikation zwischen Dukt- und Coil-Zellen

im 3D Modell die Zellidentität verändert oder es zum Identitätsverlust der charakteristischen Merkmale eines Zelltyps kommt. Dieses Phänomen wurde ebenfalls von Sato *et al.* und weiteren in Studien auf dem Gebiet der Schweißdrüsen-Forschung beschrieben (Cui & Schlessinger, 2015; Sato *et al.*, 1989).

Substance P, CGRP und S100 stellen eine Gruppe von Neuropeptiden, Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteinen und Modulatoren dar, die die Sekretion in ekkrinen Schweißdrüsenzellen beeinflussen können (Bovell, 2015; Vilches *et al.*, 2012; Zancanaro *et al.*, 1999). Substance P hat dabei eine inhibierende Wirkung auf die Sekretion, CGRP hingegen eine stimulierende (Kumazawa *et al.*, 1994; Vilches *et al.*, 2012). Wie zuvor beschrieben, ist die Lokalisation von S100 in der Literatur uneinheitlich, da S100 neben *clear cells* teilweise auch Myoepithelzellen markiert (Wilke *et al.*, 2006). Zancanaro *et al.* zeigten *in vivo* Substance P spezifisch in sezernierenden *clear cells* sowie CGRP in sezernierenden *dark cells* (Zancanaro *et al.*, 1999). Zur Unterscheidung von *clear* und *dark cells* im 3D Modell bieten sich daher Substance P und CGRP an. Diese beiden sezernierenden Zelltypen des Coils sind in die Sekretion involviert. *Clear cells* besitzen eine Vielzahl von Mitochondrien und sind hauptsächlich an der Sekretion von NaCl und somit an der Bildung des Primärschweißes beteiligt (Bovell, 2015). Die Rolle und die Funktion der *dark cells* ist jedoch aufgrund der Schwierigkeiten bei der Isolation sowie bei der Kultivierung dieses Zelltyps weitestgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass *dark cells* an der Freisetzung antimikrobieller Peptide, wie Dermcidin oder Sialomucin, beteiligt sind (Bovell, 2015; Cui *et al.*, 2012; Cui & Schlessinger, 2015). Die Färbung zeigte im 3D Coil-Modell basolateral eine intensive Färbung beider Marker, sodass hier *clear* und *dark cells* vorlagen. Zum spezifischen Nachweis von *clear* und *dark cells* wurde eine Co-Lokalisation (Doppelfärbung) im Modell durchgeführt, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

Der Myoepithelzell-Marker  $\alpha$ -SMA (Kurata *et al.*, 2014; Schon *et al.*, 1999) wurde insbesondere in 3D Co-Kultur Modellen, schwächer im 3D Coil-Modell und nicht in 3D Dukt-Modellen nachgewiesen. Die  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen bildeten dabei eine äußere, das 3D Modell umrandende Zellschicht. Myoepithelzellen sind insbesondere für den Strukturhalt und bei der Ausstoßung des sekretierten Primärschweißes behilflich (Saga, 2002; Sato *et al.*, 1991). Dies könnte möglicherweise auf eine Zellschicht im 3D Modell hindeuten, welche die Struktur des 3D Modells erhält oder sogar nach

Stimulation befähigt ist, zu kontrahieren. Jedoch liefert die  $\alpha$ -SMA Immunfluoreszenz für eine solche Funktion keinen Nachweis. Die Daten zeigen aber, dass sezernierende *clear* und *dark cells* sowie Myoepithelzellen in den 3D Modellen vorkamen. Zudem könnte der Nachweis der Neuropeptide Substance P und CGRP sowie des Rezeptors GalR2 auf Zellen im 3D Modell hindeuten, welche über regulatorische Funktionen im Bezug zur Sekretion verfügen könnten.

Zur Co-Lokalisation von *clear cells* sowie *dark cells* in 3D Co-Kultur- und 3D Coil-Modellen wurden simultan die Marker Substance P und CGRP in der Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt (Abb. 23). Wie zuvor beschrieben, wird Substance P *in vivo* spezifisch in *clear cells* sowie CGRP spezifisch in *dark cells* exprimiert (Zancanaro *et al.*, 1999). Im 3D Co-Kultur Modell wurden *clear cells* vermehrt luminal und *dark cells* eher basolateral detektiert. Teilweise wurde eine leicht unspezifische Färbung beider Marker in Zellen des 3D Co-Kultur Modells beobachtet. Im 3D Coil-Modell hingegen wurden sowohl *clear cells* als auch *dark cells* stark in den äußeren Zellschichten der Sphäre, aber nicht luminal nachgewiesen. Die Lokalisation der beiden Marker in der Zelle an sich war jedoch identisch; Substance P zeigte sich insbesondere in der Nähe des Zellkerns. Dies könnte auf die Induktion der Proliferation und den Schutz vor Apoptose hindeuten (Gonzalez Moles *et al.*, 2009). Hingegen wurde CGRP in der Zellmembran der 3D Modelle detektiert. *Dark cells* enthalten eine Vielzahl von Granula, welche mit weiteren Substanzen bei der Sekretion in das Coil-Lumen abgegeben werden (Bovell, 2015). Möglicherweise befand sich CGRP in den *dark cells* der 3D Modelle aus diesem Grund in der Nähe der Membran, um nach der Stimulation ebenfalls an die äußere Umgebung sekretiert zu werden. Bei der Freisetzung bindet CGRP an dessen korrespondierenden Rezeptor und aktiviert dabei einen cAMP-gesteuerten Signalweg (Russo, 2015). Ein solcher Wirkmechanismus könnte eventuell auch im 3D Modell möglich sein. Die Verteilung dieser beiden Zelltypen ist im nativen Zustand ca. 50 % zu 50 % (Bovell, 2015). Hier zeigte nicht jede Zelle im 3D Co-Kultur Modell und im 3D Coil-Modell eine Substance P- oder eine CGRP-Markierung. Dies könnte, wie bereits erwähnt, auf einen Identitätsverlust oder die Reprogrammierung der Zellen hindeuten, wie es von Cuthbert *et al.* und Sato *et al.* in ekkrinen Schweißdrüsenzellen der 2D Kultur beschrieben wurde (Cuthbert *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1989). Nichtsdestotrotz konnten *clear* und *dark cells* erfolgreich in 3D Modellen der Schweißdrüse identifiziert werden.

Das Intermediärfilament Nestin, welches zur Identifizierung von Stammzellpopulationen in der Haut, u.a. auch bei ekkrinen Schweißdrüsen, eingesetzt wird (Nagel *et al.*, 2013; Petschnik *et al.*, 2010; Tiede *et al.*, 2009), konnte nicht in 3D Co-Kultur Modellen nachgewiesen werden (Abb. 22, Q-T). Demgegenüber war der Nachweis in 3D Modellen des Coils und des Dukts erfolgreich. Außerdem unterschied sich die Lokalisation dieses Markers, da dieser in 3D Coil-Modellen im Zytoplasma von luminalen Zellen und in 3D Dukt-Modellen in der Nähe des Nucleus detektiert wurde. Nestin als Intermediärfilament des Cytoskeletts wurde weiterhin auch als Regulator der Genexpression beschrieben (Thomas *et al.*, 2004). Dabei hängt die Funktion von der Lokalisation des Proteins – Zytoplasma oder Nucleus – ab. In der Nähe des Nucleus kann Nestin die Genexpression regulieren, was mit erhöhter Proliferation in Verbindung gebracht wird (Krupkova *et al.*, 2011). Dies deutet darauf hin, dass Zellen des 3D Dukt-Modells vermehrt proliferativ sowie undifferenziert vorlagen und diesen Stammzell-assoziierten Marker exprimierten. 3D Co-Kultur Modelle wiesen dagegen keine Nestin-positiven Zellen auf und exprimierten wahrscheinlich eher Differenzierungs-assoziierte Marker. 3D Coil-Modelle zeigten ebenfalls Nestin-positive Zellen, aber im Zytoplasma. Mithilfe des Nestin-Markers konnten im 3D Modell (Coil, Dukt) Zellen mit Stammzellpotenzial nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der Proliferation wurden die Zellen des 3D Modells hinsichtlich der Expression des nukleären Markers Ki67 in der Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abb. 22, U-X). Ruhende Zellen der G0-Phase des Zellzyklus werden dabei nicht detektiert. Während der Interphase befindet sich das Ki67-Protein im Zellkern, sodass proliferierende Zellen einer Zellpopulation anhand dieses Merkmals charakterisiert werden können (Scholzen & Gerdes, 2000). In der nativen Drüse wurde Ki67 in wenigen proliferierenden Zellen des Dukts und vermehrt im Coil punktuell markiert. Die Lokalisation des Ki67-Markers war nativ größtenteils in der Nähe des Zellkerns. Im 3D Co-Kultur Modell wurde Ki67 stark basolateral nachgewiesen, wohingegen in den 3D Coil- sowie in den 3D Dukt-Modellen nur eine schwache basolaterale Färbung erkennbar wurde. Diese Markierung war dagegen nicht punktuell, sondern wurde in der Membran nachgewiesen. In der Literatur wurde dies trotz Verwendung eines monoklonalen Antikörpers zwar als Artefakt interpretiert, aber auch als Kreuzreaktion mit weiteren Antigenen, welche ein ähnliches Epitop besitzen (Leonardo *et al.*, 2007). Damit konnten mithilfe des Ki67-Antikörpers proliferierende Zellen im 3D Modell nicht eindeutig identifiziert werden. Es bedarf der weiteren Analyse. Edmondson *et al.* deuten

allerdings an, dass sich proliferierende Zellen in 3D Modellen meist basolateral in der Proliferationszone befinden (Edmondson *et al.*, 2014), was mit den hier gezeigten Ergebnissen im Einklang wäre.

Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Populationsanteil bestimmter Zelltypen in der 2D Kultur anhand charakteristischer Marker quantitativ bestimmt, was mithilfe der Immunfluoreszenz nicht möglich war (Abb. 24). Somit konnte ein Rückschluss auf die Proteinexpression und auf einen möglichen Funktionsverlust der Marker in den 2D-kultivierten Zellen getroffen werden. Diese 2D-kultivierten Zellen wurden dann in das 3D Modell überführt. Mit den Markern CK19, CEACAM5, CFTR und NKCC1 wurden sowohl Coil- als auch Dukt-Zellen markiert. In der 2D Co-Kultur Zellpopulation waren ca. 96% NKCC1- und CFTR-positiv, sodass diese die höchst exprimierten Marker in der 2D Co-Kultur darstellten. Da CFTR nicht von Fibroblasten der Haut exprimiert wird (Zhang *et al.*, 2012), kann eine Verunreinigung in der Kultur mit dermalen Fibroblasten nahezu ausgeschlossen werden. In der Zelllinie NCL-SG3 wurde CFTR hingegen nicht exprimiert (Servetnyk & Roomans, 2007), was den Vorteil der primären Zellen hier aufzeigte. Die Coil-spezifischen Marker CHRM3, ANO1 und AQP5 wurden in ca. 61-73 % in der Co-Kultur nachgewiesen. Substance P als *clear cell*-Marker wurde mit ca. 7 % in der Zellpopulation nachgewiesen und CGRP mit ca. 70 % für *dark cells*. Der Nachweis des Myoepithelzellen-Marker  $\alpha$ -SMA bestätigt, dass dieser Zelltyp mit ca. 32 % ebenso in der 2D Co-Kultur vorlag. Der Dukt-Marker CD200 (Biedermann *et al.*, 2010) zeigte mit ca. 3 % einen sehr geringen prozentualen Anteil der Dukt-Zellen, sodass dieser Zelltyp zur Analyse auf andere Weise kultiviert werden sollte. Außerdem sollten zur Identifizierung von Dukt-Zellen weitere Dukt-spezifische Marker, wie beispielsweise CK1 und CK77 (Langbein *et al.*, 2008), untersucht werden. Nestin als Stammzellmarker zeigte sehr hohe Expressionen, was mit der Proliferation der Zellen in Verbindung gebracht wurde (Krupkova *et al.*, 2011). Die Daten weisen auf einen geringen prozentualen Anteil von Dukt-Zellen, einen sehr hohen prozentualen Anteil von Zellen mit Stammzellpotenzial und auf eine geringe Differenzierung der Zellen in der 2D Co-Kultur hin.

Bis auf CD200 waren alle hier untersuchten Marker im nativen Coil-Kompartiment nachweisbar. Im Vergleich waren diese Marker in der 2D Coil-Kultur stark verringert exprimiert. In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass zur Aufrechterhaltung der Identität und der Funktion jeder einzelne Zelltyp der ekkrinen Schweißdrüse in der

*in vitro* Kultur vertreten sein muss. Außerdem wurde festgestellt, dass Schweißdrüsenzellen *in vitro* schnell ihre Eigenschaften verlieren (Cui & Schlessinger, 2015; Sato *et al.*, 1989). Dies könnte das Phänomen in der 2D Coil-Kultur, welche im Vergleich zur 2D Co-Kultur stark verringerte Marker-Expressionen aufzeigte, erklären. Außerdem wurde Nestin in der 2D Coil-Kultur nur zu ca. 40 % exprimiert. Möglicherweise ist dieser Marker-Verlust auch auf den geringen Anteil der Nestin-positiven Stammzellen zurückzuführen. Da exokrine Drüsen bei der Sekretion Zellen verlieren, müssen sog. Vorläuferzellen zum Erhalt des Gewebes existieren (Benninghoff, 1985; C.P. Lu *et al.*, 2012). Die Nestin-positiven Zellen könnten somit in der 2D Kultur sowie im 3D Modell als Regulatoren der Homöostase und der Regeneration fungieren. Zudem könnten Schweißdrüsenzellen mit multipotenten Zellen in der Kultur interagieren und Signale austauschen, was mehrfach als epitheliale-mesenchymale Interaktion beschrieben wurde (Tucker *et al.*, 2000; Velez-delValle *et al.*, 2016). Möglich ist jedoch, dass sich der prozentuale Populationsanteil der Zellen vom Übergang der 2D Kultur in das 3D Modell stark verändert. Dementsprechend sollte die Durchflusszytometrie an im 3D Modell-kultivierten Zellen durchgeführt werden, was die Dissoziation der Zellen aus dem 3D Modell zur Analyse voraussetzt.

Für die Funktionalität der Epithelzellen im 3D Schweißdrüsen-Modell spielt neben der Expression Schweißdrüsen-spezifischer Marker insbesondere die apikal-basale Polarität eine entscheidende Rolle (Ilantzis *et al.*, 2002; Nelson, 2009). Hauptsächlich ist die apikal-basale Polarität für die Differenzierung der Zellen (Li *et al.*, 2015), deren Physiologie – insbesondere beim Ionentransport in Epithelgewebe – und beim Austausch von Nährstoffen sowie Abfallprodukten zwischen interner und externer Umgebung essentiell (Nelson, 2009; Okuyama *et al.*, 2016; Zanoni *et al.*, 2016). Die Orientierung wurde mittels Co-Lokalisation des basolateralen Markers CHRM3 und des luminalen Markers ANO1 des Coils im 3D Co-Kultur Modell analysiert (Abb. 25). Im *whole mount*-gefärbten 3D Modell wurde ANO1, welches für die Cl<sup>-</sup>-Akkumulation im Lumen verantwortlich ist (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014; Saint-Criq & Gray, 2017), apikal detektiert. Simultan wurde CHRM3, der muskarine ACh-Rezeptor, basal nachgewiesen, was ebenfalls der *in vivo* Situation entspricht. Demzufolge konnte die Funktionalität der epithelialen Zellen, die von der korrekten apikal-basalen Polarität abhängig ist, und damit die differenzierte sog. *histoarchitecture* (Mazzoleni *et al.*, 2009) im 3D Co-Kultur Modell belegt werden. Die Formation eines Lumens im 3D Modell

konnte hier anhand der Doppelfärbung nicht eindeutig gezeigt werden. Möglicherweise bildet nicht jede Sphäre *de novo* ein Lumen aus, wie es auch von Li *et al.* gezeigt wurde (Li *et al.*, 2015). Dies könnte auch hier der Fall sein. Die apikal-basale Polarität im 3D Co-Kultur Modell konnte jedoch mithilfe der Marker ANO1 und CHRM3 *in vitro* bestätigt werden, was der Physiologie der ekkrinen Schweißdrüse entspricht.

Basierend auf den Untersuchungen zur Gen- und Proteinexpression sowie zur apikal-basalen Polarität konnten die 3D Modelle (Co-Kultur, Coil, Dukt) anhand Schweißdrüsen-spezifischer Marker charakterisiert werden. Durch den Vergleich der 3D Modelle mit den 2D Kulturen wurden spezifische Marker der ekkrinen Schweißdrüse wie CHRM3 und AQP5 auf Gen- und Proteinebene erhöht im 3D Modell nachgewiesen. Insbesondere wurde dies im 3D Co-Kultur Modell deutlich. Zudem entsprach bei Kultivierung von Coil- und Dukt-Zellen im 3D Co-Kultur Modell die apikal-basale Polarität der *in vivo* Situation. Dementsprechend wurden die Studien zur cholinergen Stimulation und zum physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling an 3D Co-Kultur Modellen durchgeführt, um den Sekretionsprozess *in vitro* an ekkrinen Schweißdrüsenzellen analysieren zu können.

#### **4.3 Cholinerge Stimulation und physiologisches $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling in 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse**

Ekkrine Schweißdrüsen werden cholinerg über das sympathische Nervensystem innerviert (Grant *et al.*, 1991). Dies erfolgt neben der  $\alpha\beta$ -adrenergen Stimulation und einigen Modulatoren, wie z.B. dem Neuropeptid Galanin (Bovell *et al.*, 2013), hauptsächlich über den Neurotransmitter ACh (Sato & Sato, 1981). Nach der cholinergen Stimulation der ekkrinen Schweißdrüse kommt es zum intrazellulären Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels, das sowohl intrazellulär aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch extrazellulär über die Plasmamembran aus dem Interzellularraum in die Zelle einströmt. Schließlich kommt es im sezernierenden Coil durch die Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs zur Transduktion sowie zur Bildung des Primärschweißes.  $\text{Ca}^{2+}$  als ubiquitärer Neurotransmitter ist allerdings nicht nur an der Sekretion (Henderson & Cuthbert, 1991), sondern an einer Vielzahl zellulärer Mechanismen von Humanzellen, wie beispielsweise der Zellproliferation, der Zellteilung und der Differenzierung, beteiligt (Berridge *et al.*, 2000; Capiod, 2011).

Zur Validierung des 3D Modells wurde der Einfluss der cholinergen Stimulation auf ekkrine Schweißdrüsenzellen mithilfe des natürlichen Neurotransmitters ACh *in vitro* untersucht. Ziel der Studie war somit die Analyse der Gen- und Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker nach cholinergem Stimulation. Außerdem wurde das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signalling mithilfe des Fluo-4 Assays im 3D Modell analysiert, um die Physiologie des rekonstruierten 3D Modells aufzuzeigen. Möglicherweise könnte auch die Kultivierung durch den Neurotransmitter-Zusatz optimiert werden.

Zunächst wurde die Viabilität und die Vitalität in den 3D Modellen untersucht, um einen zytotoxischen, apoptotischen und/oder einen nekrotischen Effekt der ACh-Stimulation auszuschließen (Abb. 26+27). Insgesamt konnte durch die Quantifizierung der Fluoreszenzen kein signifikanter Vitalitäts-steigernder Effekt durch ACh in den 3D Modellen (Co-Kultur, Coil, Dukt) nachgewiesen werden, jedoch wurde ein Einfluss auf die Zelltodrate detektiert. Bei einer Langzeitkultivierung konnten an D7 in 3D Co-Kultur Modellen leicht verringerte Zelltodraten nach ACh-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten 3D Modellen festgestellt werden (Abb. 27a). Hingegen wurde ein leichter Anstieg toter Zellen in 3D Coil-Modellen mit Stimulation gezeigt. Bei 3D Dukt-Modellen wurde zwar teilweise ein optischer Effekt erkannt, jedoch schwankte dieser enorm. Trotzdem wurde nach Quantifizierung im Mittel kein Unterschied nachgewiesen. Dieser Zusammenhang könnte auf den Energiemetabolismus bei der Sekretion in der ekkrinen Schweißdrüse zurückgeführt werden. Durch cholinerge Stimulation wird intrazellulär eine Signalkaskade ausgelöst und bestimmte energiebedürftige Kanäle sowie Transporter werden aktiviert. Diese verbrauchen insbesondere Glucose und Glykogen. Zudem kommt es bei der Stimulation zur Bildung von Laktat und CO<sub>2</sub> (Sato & Dobson, 1973). Möglicherweise hängt ein hoher Energiebedarf und die Produktion von Abfallprodukten, wie Laktat und CO<sub>2</sub>, mit der Viabilität zusammen, sodass eine erhöhte Sekretionsrate wie im 3D Coil-Modell Zelltod induzieren könnte. Studien von Adrian *et al.* zeigten außerdem, dass eine prolongierte Stimulation nicht durch den Energiemetabolismus gesättigt werden kann. Demzufolge ist eine dauerhafte Stimulation der Schweißdrüsen in der Kultur möglicherweise nicht von Vorteil. Des Weiteren treten auch interindividuelle Unterschiede bei der Sekretionsrate auf (Adrian *et al.*, 1977), sodass die Spendervariabilität im Bezug zur Viabilität hier untersucht werden sollte.

Mithilfe der *Next generation* Sequenzierung (NGS) und der qRT-PCR-Analyse wurde der Einfluss der ACh-Stimulation auf die Genexpression analysiert, um so eine mögliche Genexpressionsänderung durch ACh in den 3D Modellen feststellen zu können (Abb. 28-30). Die bereits mehrfach untersuchten Schweißdrüsen-spezifischen Marker wurden auch in der NGS-Analyse größtenteils in den 3D Modellen nachgewiesen und exemplarisch in Abb. 28 und 29 dargestellt. Auf Ebene der Transkription wurde dabei eine Vielzahl dieser Marker im 3D Modell ähnlich zur *in vivo* Drüse exprimiert. Dies war in erster Linie im 3D Co-Kultur Modell der Fall. In den 3D Modellen (Co-Kultur, Coil, Dukt) wurde die Genexpression außerdem meist nicht durch ACh beeinflusst. Einige Gene, wie beispielsweise CD200, AQP5 oder CGRP, wurden zudem sehr gering oder nicht in den 3D Modellen nachgewiesen, was auf die Reprimierung dieser Marker in der *in vitro* Kultur hindeutet. Ebenfalls ist hier eine Regulation auf Ebene der Translation, d.h. auf Proteinebene, denkbar (Brown *et al.*, 1995). Daher ist für gering exprimierte Marker, wie CD200, AQP5 oder CGRP, wohlmöglich die Regulation auf Ebene der Translation entscheidender. Aufgrund der limitierten Probenanzahl in der NGS-Analyse wurde der Effekt der cholinergen Stimulation auf die Genexpression zusätzlich mittels qRT-PCR validiert und näher analysiert. Mithilfe dieser Untersuchung wurde erneut ersichtlich, dass nur geringe, aber keine statistisch signifikanten Genexpressionsänderungen nach ACh-Stimulation (ausgenommen GalR3 in 3D Coil-Modellen) vorlagen (Abb. 30). Der Marker GalR3 ist an der Sekretion in ekkrinen Schweißdrüsen beteiligt (Bovell *et al.*, 2013), sodass die cholinerge Stimulation möglicherweise auch die Genexpression dieses Sekretionsmarkers induzierte. Insgesamt konnte jedoch nach cholinergischer Stimulation durch ACh kein eindeutiger Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Schweißdrüsen-spezifischen Marker mittels NGS-Analyse und mittels qRT-PCR nachgewiesen werden.

Für die Regulation ist nicht alleinig die Genexpression ausschlaggebend, da bestimmte Marker über die Translation reguliert werden (Brown *et al.*, 1995; Cooper & Hausmann, 2003). Daher wurde die Proteinexpression der Schweißdrüsen-spezifischen Marker AQP5, CHRM3, NKCC1 und Nestin nach cholinergischer Stimulation in 3D Co-Kultur Modellen mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 31). Es konnte belegt werden, dass die Marker verstärkt sowie mit veränderter Lokalisation im 3D Co-Kultur Modell identifiziert wurden. Insbesondere der Marker AQP5, welcher für den transzellulären Wassertransport verantwortlich ist (Ishikawa & Ishida, 2000), wurde mit

erhöhter Intensität und veränderter Lokalisation im 3D Modell nachgewiesen. Die deutlich intensiveren Fluoreszenzsignale deuten auf eine erhöhte AQP5-Proteinmenge hin und damit auf die Regulation auf Proteinebene. Des Weiteren wurde eine Mobilisierung von AQP5 nach der ACh-Stimulation in den Zellen des 3D Modells gezeigt. Kitchen *et al.* beschrieben drei Regulationsmechanismen von AQP5, die den Wassertransport über (a) die Transkription/Translation, (b) die Konformationsänderung des Proteins oder über (c) die Translokation von AQP5 steuern. Die Wasserpermeabilität der Zelle wird so je nach externen oder zellulären Signal dynamisch reguliert (Kitchen *et al.*, 2015). Die Lokalisation dieses Markers spielt eine entscheidende Rolle, da zur erhöhten Wasserdurchlässigkeit Aquaporin-Kanäle zu ihrer Target-Membran transloziert werden (Borok *et al.*, 2000; Kitchen *et al.*, 2015; Nejsum *et al.*, 2002). In mehreren Publikationen wurde AQP5 nativ sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Membran der sezernierenden *clear cells* im Coil entdeckt (Du *et al.*, 2016; Nejsum *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde von Ishikawa *et al.* und weiteren Arbeitsgruppen beschrieben, dass nach Stimulation des CHRM3-Rezeptors und nach intrazellulärem  $Ca^{2+}$ -Signalling eine Translokation von AQP5 vom Zytoplasma an die apikale Membran stattfindet (Ishikawa *et al.*, 1998; Kitchen *et al.*, 2015). Du *et al.* zeigten hingegen, dass AQP5 nicht nur apikal, sondern auch basolateral in der Zellmembran detektiert wurde (Du *et al.*, 2016), sodass die genaue Lokalisation von AQP5 nach cholinerg Stimulation umstritten ist. Im 3D Co-Kultur Modell wurde AQP5 im unbehandelten Zustand größtenteils in den äußeren Zellschichten der Sphäre (basolateral) gezeigt. AQP5 wurde jedoch nach ACh-Stimulation im gesamten 3D Co-Kultur Modell detektiert, was für die Translokation von AQP5 spricht. Dabei wurde AQP5 sowohl in der Membran als auch im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen. Ishikawa *et al.* beschrieben ein ähnliches Phänomen in cholinerg stimulierten Ohrspeicheldrüsenzellen. Diese zeigten – wie möglicherweise die Zellen im 3D Co-Kultur Modell – sowohl die Translokation als auch die schnelle Rückkopplung von AQP5 von der Membran ins Zytoplasma, die schon nach ca. 5 Minuten erfolgte (Ishikawa *et al.*, 1998). Dementsprechend spielt vermutlich auch der Zeitpunkt dieser Analyse in ekkrinen Schweißdrüsenzellen eine entscheidende Rolle.

Weiterhin wurden die Markerproteine CHRM3, NKCC1 und Nestin erhöht in cholinerg stimulierten 3D Co-Kulturen exprimiert. In einer Studie von Oenema *et al.* wurde an Muskelzellen aus der Lunge (*airway smooth muscle cells*) gezeigt, dass bestimmte Marker durch cholinerge Stimulation mit Metacholin (MCh) ebenfalls stark induzierte

Proteinexpressionen, aber keine Induktion in der Transkription, aufwiesen. Darunter fielen in dieser Studie auch die induziert exprimierte Proteine CHRM3, CHRM2 und  $\alpha$ -SMA. Die Regulation der Translation erfolgte in diesen Zellen durch eine erhöhte Gesamtmenge des Proteins und die Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie TGF (*transforming growth factor*), sodass der Phänotyp der Zelle sich veränderte (Oenema *et al.*, 2012). Dies entspricht in vielerlei Hinsicht den Beobachtungen im 3D Modell, da die Genexpression nach ACh-Stimulation keine Änderung im Gegensatz zur Proteinexpression zeigte. Zudem konnten in 3D Co-Kultur Modellen erhöhte Gesamtmengen der Markerproteine mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, wie es von Oenema *et al.* beschrieben wurde.

In der Immunfluoreszenz lag insbesondere das Protein AQP5 sichtbar induziert vor. Daher wurde die Gesamtmenge des Proteins AQP5 nach cholinergischer Stimulation mittels Western Blot spezifisch nachgewiesen und quantifiziert (Abb. 32). Im unbehandelten Zustand des 3D Co-Kultur Modells wurde AQP5 im Vergleich zur 2D Kultur ca. 4x erhöht nachgewiesen, sodass man von einer Induktion durch die 3D Kultivierungsmethode sprechen kann (Bartosh *et al.*, 2010; Bielecka *et al.*, 2016; Foty, 2011; Samuelson & Metzger, 2006). Nach ACh-Stimulation wurde in der 2D Kultur eine leichte, nicht signifikante Induktion der AQP5-Proteinexpression gezeigt, die im 3D Co-Kultur nicht detektiert wurde. Die Wasserpermeabilität über Aquaporine wird, wie zuvor beschrieben, auf mehreren Ebenen in der Zelle reguliert (Kitchen *et al.*, 2015). Die Daten lassen vermuten, dass die Gesamtmenge des AQP5-Proteins in der 2D Kultur nach ACh-Stimulation über die Transkription bzw. Translation gesteuert wird. Hingegen erfolgte die Regulation im 3D Modell höchstwahrscheinlich eher über die Translokation oder die Konformationsänderung von AQP5, da sich die Gesamtmenge des AQP5-Proteins nach ACh-Stimulation nicht veränderte. Ähnlich zur *in vivo* Situation würde eventuell ein cholinergischer ACh-Reiz über das gekoppelte CHRM3-Ca<sup>2+</sup>-Signalling in ein Translokations („*shuttle*“)-Signal in den Zellen des 3D Modells umgesetzt werden, wie es Ishikawa und Ishida für Speicheldrüsenzellen beschrieben (Ishikawa & Ishida, 2000).

Um einen Einblick in den transepithelialen Ionentransport, die Physiologie und die Funktionalität der ekkrinen Schweißdrüsenzellen in den 3D Modellen zu gewinnen, wurde der Ca<sup>2+</sup>-Flux und damit das intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Level im 3D Co-Kultur Modell mittels Fluo-4 Assay untersucht. In der Zelllinie NCL-SG3 kann weder eine cholinerge

noch eine  $\alpha$ -adrenerge Stimulation erzielt werden (Bovell, 2015; Bovell *et al.*, 2008; Ertongur-Fauth *et al.*, 2014; Lee & Dessi, 1989). Bei Bindung der cholinergen, purinergen und  $\alpha$ -adrenergen Mediatoren an ihre Rezeptoren kommt es zum intrazellulären Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stammen dabei aus dem Interzellularraum und aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Anschließend wird wahrscheinlich über den Phospholipase C (PLC) *pathway* eine Signalkaskade in der Zelle ausgelöst, sodass es im Endeffekt zur Primärschweißbildung kommt (Bovell, 2015; Cui & Schlessinger, 2015; Sato *et al.*, 1989). Demzufolge wurde die Stimulation mithilfe von spezifischen muskarinen und purinergen Agonisten sowie in Kombination mit muskarinen Antagonisten an primären Schweißdrüsenzellen im 3D Co-Kultur Modell mithilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fluo-4 analysiert. Steigt das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Level, so nimmt auch die Fluoreszenz zu, sodass ein quantitativer Nachweis hier möglich war. Mit muskarinen und purinergen Agonisten konnte in 3D Modellen ein starker Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  erzielt werden (Abb. 33).

Die 3D Co-Kultur Modelle wurden entweder mit Schweißdrüsenzellen aus der Gesichtsregion oder aus der Achselregion kultiviert, sodass hier auch der Einfluss der Körperregion auf das Reaktionsvermögen analysiert wurde. Dabei wurden signifikante Unterschiede in der Zellantwort auf einen Reiz festgestellt. Bei der cholinergen Stimulation mit ACh, dem muskarinen Struktur analogon Pilocarpin und dem purinergen Stimulans ATP wurde in 3D Modellen aus Achselzellen ein signifikant erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx erzeugt. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg hat die Aktivierung von  $\text{K}^{+}$ - und  $\text{Cl}^{-}$ -Kanäle sowie NKCC1 zur Folge (Cui *et al.*, 2012; Saga, 2002), was *in vivo* zur Schweißsekretion führt (Cui & Schlessinger, 2015). ATP bewirkt durch die Aktivierung purinergere Rezeptoren ebenfalls die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung, was gleichermaßen die Aktivität der Schweißsekretion steuert (Ko *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1995). Zudem führt die Stimulation zum Efflux von  $\text{Cl}^{-}$ -Ionen über CFTR (Servetnyk & Roomans, 2007) und den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^{-}$ -Kanal ANO1 (Ertongur-Fauth *et al.*, 2014). Im nativen Coil führt dies zur Hyperpolarisierung der Zellen und im Endeffekt zum osmotischen Nachzug von Wasser in das Coil-Lumen. Dieser  $\text{Cl}^{-}$ -Ausstrom konnte in einer Studie von Servetnyk und Roomans mithilfe eines Chlorid-Fluorophors in der Zelllinie NCL-SG3 gezeigt werden. Allerdings wurde CFTR im Gegensatz zum 3D Modell in NCL-SG3-Zellen auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen (Servetnyk & Roomans, 2007), sodass das 3D Modell diesbezüglich Vorteile aufweist.

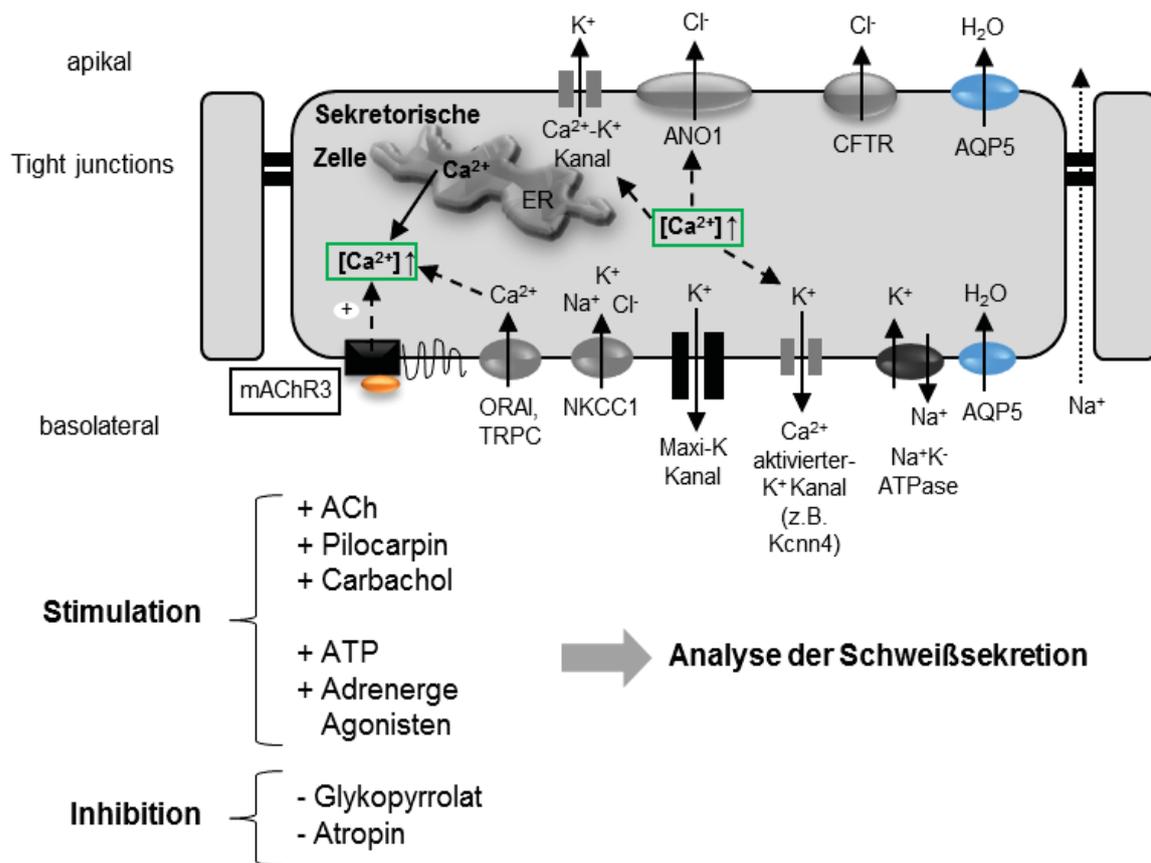
Des Weiteren wurde der Einfluss von Ionen im extrazellulären Raum auf das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Level in den 3D Modellen untersucht. Nach Zugabe von  $\text{K}_2\text{SO}_4$  stieg das Fluoreszenzsignal in 3D Modellen aus Achselzellen im Vergleich zu 3D Modellen aus Gesichtszellen der Schweißdrüse signifikant an. Durch die extrazelluläre Zugabe von  $\text{K}_2\text{SO}_4$  wurde in Zellen des 3D Modells wahrscheinlich auch das Ionengleichgewicht und somit das Membranpotenzial der Zelle beeinflusst, wie es von Hertz *et al.* in Astrozyten und Neuronen ebenfalls gezeigt wurde (Hertz *et al.*, 2013). Sulfat ist für die Zelle impermeabel, sodass hier nur das Kaliumgleichgewicht durch das erhöhte extrazelluläre  $\text{K}^+$  enorm beeinflusst wurde. Dies hatte eine starke Zunahme des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels zur Folge. Durch die cholinerge Stimulation wurden die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase sowie der sekundär aktive Cotransporter NKCC1 stimuliert, wie es von DiNuzzo *et al.* in Neuronen des Gehirns in einer weiteren Studie beschrieben wurde (DiNuzzo *et al.*, 2013). Auch in ekkrinen Schweißdrüsenzellen, die sowohl über die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase als auch über den Cotransporter NKCC1 verfügen, ist dieser Mechanismus denkbar.

Die Zelle strebt nach der Stimulation wieder an, den Ausgangszustand mit ihrem negativem Potenzial zu erreichen, sodass  $\text{K}^+$  wieder – beispielsweise durch *Kcnn4* (Saint-Criq & Gray, 2017) – in das Interstitium strömt (Lei *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 1989). Xu *et al.* berichteten von der Induktion intrazellulärer IP3-PLC-Signalwege infolge der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-Aktivierung, die den Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels in Astrozyten bewirkte (Xu *et al.*, 2013). Dies lässt vermuten, dass diese komplexen Prozesse zur Signalweiterleitung des elektrischen Reizes ebenfalls in Schweißdrüsenzellen und daher in Zellen des 3D Modells ablaufen. Dies könnte die Schweißsekretion beeinflussen.

Zur Analyse der Inhibition wurde Glykopyrrolat (Glykopyrroniumbromid) eingesetzt, welches als muskariner Antagonist und als Anticholinergikum wirkt (Namba *et al.*, 2017). Diese Substanz wird außerdem bei der Behandlung von Hyperhidrose angewendet (Kreyden & Scheidegger, 2004). Die ekkrinen Schweißdrüsenzellen in den 3D Modellen wurden ebenfalls mit Glykopyrrolat behandelt, welches eine kompetitive CHRM3-Hemmung bewirkt (Cui & Schlessinger, 2015). Glykopyrrolat bindet mit 3-5x höherer Affinität an CHRM3 als an CHRM1 und CHRM2 (Moulton & Fryer, 2011). Bei anschließender Zugabe von ACh konkurrieren der Agonist und der Antagonist um die Bindestellen der muskarinen Rezeptoren. Der Antagonist

Glykopyrrolat in Kombination mit dem Agonisten ACh hatte unterschiedliche Wirkungen, je nachdem aus welcher Körperregion die Schweißdrüsenzellen des 3D Modells stammten. Trotz des Einsatzes identischer Konzentrationen wurde die Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux nur in 3D Modellen aus Gesichtsschweißdrüsenzellen und nicht in 3D Modellen aus Achselschweißdrüsenzellen erreicht. Eine Studie von Ikeda *et al.* zeigte, dass die Selektivität eines Antagonisten je nach Gewebe unterschieden werden muss (Ikeda *et al.*, 2002). Dies lässt die Vermutung zu, dass Schweißdrüsenzellen je nach Körperregion aufgrund ihrer Affinität zum Liganden in unterschiedlicher Intensität stimuliert und inhibiert werden könnten. Nach dieser Auffassung würden Schweißdrüsenzellen der Achsel somit eine besonders hohe Affinität zum Liganden ACh besitzen. Weiterhin ist eine erhöhte Distribution der CHRM3-Rezeptoren in ekkrinen Schweißdrüsen der Achsel-/Oberarmregion denkbar, sodass eine erhöhte Anzahl dieser Rezeptoren in der Membran auch zur erhöhten Induktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs führen könnte. Dies könnte Gegenstand von weiteren Studien sein. Des Weiteren sollten zusätzliche Antagonisten (siehe Tab. 12) einzelner Ionenkanäle, wie z.B. Furosemid als spezifischer NKCC1-Inhibitor (Hertz *et al.*, 2013; Quinton, 1981), untersucht werden, um deren Einfluss im rekonstruierten 3D Modell zu analysieren und die Schweißdrüsenzellen anhand ihrer physiologischen Funktionalität weiter zu charakterisieren.

Der ekkrine Sekretionsmechanismus mit involvierten Rezeptoren, Ionenkanälen und Transportern wurde in einem Schema zusammengefasst (Abb. 35). Nach der Stimulation konnte mithilfe des Fluo-4 Calcium Flux Assays der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg in sezernierenden Zellen des Coils im 3D Co-Kultur nachgewiesen und damit die physiologische Funktionalität bestätigt werden.



**Abbildung 35: Zusammenfassendes Schema des ekkrinen Sekretionsmechanismus in einer sezernierenden Schweißdrüsenzelle.** Schema zeigt in die Primärschweißbildung involvierte Ionenkanäle, Transporter und Rezeptoren einer *clear cell* der ekkrinen Schweißdrüse. In der nativen Schweißdrüse wird der aktivierte Ca<sup>2+</sup>-Influx durch das Endoplasmatische Retikulum und durch Kanäle der basalen Plasmamembran (ORAI/TRPC) gesteuert. Das physiologische Ca<sup>2+</sup>-Signalling wurde mithilfe von Agonisten und Antagonisten in 3D Co-Kultur Modellen mittels des Fluo-4 Calcium Flux Assays analysiert.

#### 4.4 Integration von 3D Modellen der ekkrinen Schweißdrüse in ein Phenion-Vollhautmodell

Um den Einfluss der 3D Modelle der ekkrinen Schweißdrüse auf die Haut näher zu analysieren, wurden die organotypischen rekonstruierten 3D Modelle in ein Phenion-Vollhautmodell integriert. Das Phenion-Vollhautmodell besitzt die typischen Eigenschaften der humanen Haut. Es besteht aus einem dermalen und einem epidermalen Kompartiment, welche über eine Basalmembran miteinander verbunden sind. Der dermale Teil besteht aus einer speziellen Kollagen-Matrix und Fibroblasten, während der epidermale Teil aus sich terminal differenzierenden Keratinozyten besteht. Ähnlich zur *in vivo* Situation wurden hierbei die 3D Modelle in den dermalen Teil des Phenion-Modells integriert. Bisher wurden noch keine *in vitro* Vollhautmodelle

entwickelt, welche Hautanhangsgebilde enthalten (Ackermann *et al.*, 2010; Bellas *et al.*, 2012; Diekmann *et al.*, 2016; Reijnders *et al.*, 2015). Die rekonstruierten Vollhautmodelle mit integrierten 3D Modellen der Schweißdrüse zeigten, dass sich einige 3D Modelle der Schweißdrüse im oberen Bereich, angrenzend zur Epidermis befanden und nicht regulär verteilt waren. Auffällig ist jedoch, dass im Randbereich der Vollhautmodelle eine neue verhornte Schicht von Zellen gebildet wurde, welche eine regenerierte Epidermis darstellen könnte. An dieser Stelle muss die genaue Herkunft der Zellen – Schweißdrüsen oder auch Keratinozyten – durch Immunfluoreszenzfärbungen mithilfe von Schweißdrüsen-spezifischen Markern näher analysiert und identifiziert werden. Biedermann *et al.* und weitere beschrieben ebenfalls, dass ekkrine Schweißdrüsenzellen – insbesondere Coil-Zellen – aufgrund ihres Stammzellpotenzials und ihrer Migrationsfähigkeit *in vivo* und *in vitro* in der Lage sind, die Epidermis zu rekonstruieren (Biedermann *et al.*, 2010; Pontiggia *et al.*, 2014). Dieser Prozess, der beispielsweise bei der Verletzung von Haut vorkommt, wird als Re-Epithelialisierung bezeichnet. Somit stellen ekkrine Schweißdrüsenzellen eine zusätzliche Quelle zu Keratinozyten dar, welche befähigt sind, die Epidermis zu regenerieren (Biedermann *et al.*, 2010). Dieser Mechanismus wurde auch im Wundheilungsmodell „*Human Skin punch model*“ des Fraunhofer Instituts dargestellt. Nach dem Stanzen von Humanhaut konnte die Haut ebenfalls eine regenerierte Epidermis aufweisen (Kruse *et al.*). Diese regenerierten Zellen stammten in diesem Fall jedoch aus der epidermalen Schicht der Haut. Möglicherweise fand im Vollhautmodell mit integrierten 3D Modellen der Schweißdrüse ebenfalls ein Re-Epithelialisierungs-Prozess statt, allerdings nach Migration der Schweißdrüsenzellen aus dem 3D Co-Kultur Modell.

*In vitro* 3D Vollhautmodelle werden insbesondere zur Analyse der Zytotoxizität, Irritation (Welss *et al.*, 2004) und zur Wundheilung (Das *et al.*, 2015; Maione *et al.*, 2015) genutzt. Schließlich könnten die hier etablierten Vollhautmodelle mit den integrierten 3D Modellen der Schweißdrüsen als Hautanhangsgebilde zur Homöostase der Haut beitragen sowie effizientere Ergebnisse und bessere Vorhersagen bezüglich dieser Fragestellungen erzielen.

## 5 Fazit und Ausblick

Mithilfe der *Hanging drop*-Technologie konnte ein rekonstruiertes organotypisches 3D Modell der humanen ekkrinen Schweißdrüse aus Primärzellen etabliert werden. Es wurde sowohl ein 3D Modell aus Coil- und Dukt-Zellen als auch aus Zellen der einzelnen Drüsen-Kompartimente entwickelt. Die Schweißdrüsenzellen im 3D Modell wurden anhand Schweißdrüsen-spezifischer Marker mittels Gen- und Proteinexpressionsanalysen identifiziert und charakterisiert. Das aus Coil- und Dukt-Zellen entwickelte 3D Co-Kultur Modell zeigte eine apikal-basale Polarität der epithelialen Schweißdrüsenzellen mit physiologischer Funktionalität. Dieses 3D Modell könnte in erster Linie zur Identifikation von kosmetischen und pharmazeutischen Wirkstoffen zur Behandlung von fehlregulierten Schweißdrüsen Einsatz finden. Die Untersuchungen an einem rekonstruierten Vollhautmodell könnten darüber hinaus aber auch Aufschlüsse über den Einfluss der ekkrinen Schweißdrüse auf die Haut und an Wundheilungsprozessen geben.

Um die Physiologie von Dukt-Zellen und den Resorptionsprozess im Dukt noch besser verstehen zu können, sollte dieser Zelltyp im 3D Modell künftig anhand weiterer Dukt-spezifischer Marker charakterisiert werden. Zudem sollten zum Nachweis von intrazellulären Ionenströmen weitere spezifische Agonisten sowie Antagonisten bestimmter Ionenkanäle und Transporter, wie beispielsweise der NKCC1-Inhibitor Furosemid, sowie die Spenderabhängigkeit analysiert werden. Außerdem bedarf es zusätzlicher Untersuchungen zur Integration der 3D Schweißdrüsenmodelle in das Phenion-Vollhautmodell. Insbesondere sollte der Prozess der Re-Epithelialisierung aufgeklärt werden, da er den Einsatz dieses 3D Modells als Vollhautmodell mit Äquivalenten eines Hautanhangsgebildes mit Wundheilungspotenzial erweitern könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achenbach. (2004). *Hyperhidrosis: Physiologisches und krankhaftes Schwitzen in Diagnose und Therapie* (1 ed.). Steinkopff Darmstadt: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Ackermann, Borgia, Korting, Mewes, & Schafer-Korting. (2010). The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacol Physiol*, 23(2), 105-112.
- Adrian, Helmreich, Jung, Kramer, Kraymer, Linden, *et al.* (1977). *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (79 ed.): Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Amann, Zwierzina, Gamerith, Bitsche, Huber, Vogel, *et al.* (2014). Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour-stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*, 9(3), e92511.
- Ando, Kukita, Soma, & Hino. (1998). A large number of tandem repeats in the polymorphic epithelial mucin gene is associated with severe acne. *J Dermatol*, 25(3), 150-152.
- Bartosh, Ylostalo, Mohammadipoor, Bazhanov, Coble, Claypool, *et al.* (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(31), 13724-13729.
- Baur. (2015). Haut. In Baur (Ed.), *Humanbiologie für Lehramtsstudierende: Ein Arbeits- und Studienbuch*. (pp. 66-76). Heidelberg: Springer Spektrum.
- Beauchamp, Moritz, Kelm, Ullrich, Agarkova, Anson, *et al.* (2015). Development and Characterization of a Scaffold-Free 3D Spheroid Model of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes. *Tissue Eng Part C Methods*, 21(8), 852-861.
- Bellas, Seiberg, Garlick, & Kaplan. (2012). In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials. *Macromol Biosci*, 12(12), 1627-1636.
- Benninghoff. (1985). *Anatomie: Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. Cytologie, Histologie, allgemeine Anatomie und Anatomie des Bewegungsapparates*/hrsg. von Jochen Staubesand; unter Mitarb. von E.-G. Afting...[et al.]: Urban und Schwarzenberg.
- Benohanian. (2001). Antiperspirants and deodorants. *Clin Dermatol*, 19(4), 398-405.
- Benson, Cramer, & Galla. (2013). Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS*, 10(1), 5.
- Bentley, Balasubramanian, Swerdlow, Smith, Milton, Brown, *et al.* (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53-59.
- Berridge, Lipp, & Bootman. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 11-21.
- Biedermann, Bottcher-Haberzeth, Klar, Pontiggia, Schiestl, Meuli-Simmen, *et al.* (2013). Rebuild, restore, reinnervate: do human tissue engineered dermo-epidermal skin analogs attract host nerve fibers for innervation? *Pediatr Surg Int*, 29(1), 71-78.
- Biedermann, Pontiggia, Bottcher-Haberzeth, Tharakan, Braziulis, Schiestl, *et al.* (2010). Human eccrine sweat gland cells can reconstitute a stratified epidermis. *J Invest Dermatol*, 130(8), 1996-2009.
- Bielecka, Maliszewska-Olejniczak, Safir, Szczylik, & Czarnecka. (2016). Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. *Biol Rev Camb Philos Soc*.

- Bijman, & Fromter. (1986). Direct demonstration of high transepithelial chloride-conductance in normal human sweat duct which is absent in cystic fibrosis. *Pflugers Arch*, 407 Suppl 2, S123-127.
- Bijman, & Quinton. (1984). Influence of abnormal Cl<sup>-</sup> impermeability on sweating in cystic fibrosis. *Am J Physiol*, 247(1 Pt 1), C3-9.
- Borok, Li, Fernandes, Zhou, Ann, & Crandall. (2000). Differential regulation of rat aquaporin-5 promoter/enhancer activities in lung and salivary epithelial cells. *J Biol Chem*, 275(34), 26507-26514.
- Bovell. (2015). The human eccrine sweat gland: Structure, function and disorders. *Journal of Local and Global Health Science*, 2015 1,5.
- Bovell, Corbett, Holmes, Macdonald, & Harker. (2007). The absence of apoeccrine glands in the human axilla has disease pathogenetic implications, including axillary hyperhidrosis. *Br J Dermatol*, 156(6), 1278-1286.
- Bovell, Holub, Odusanwo, Brodowicz, Rauch, Kofler, et al. (2013). Galanin is a modulator of eccrine sweat gland secretion. *Exp Dermatol*, 22(2), 141-143.
- Bovell, Kofler, & Lang. (2009). PAR-2 receptor-induced effects on human eccrine sweat gland cells. *J Med Invest*, 56 Suppl, 371-374.
- Bovell, Santic, Kofler, Hermann, Wilson, Corbett, et al. (2008). Activation of chloride secretion via proteinase-activated receptor 2 in a human eccrine sweat gland cell line--NCL-SG3. *Exp Dermatol*, 17(6), 505-511.
- Brayden, & Cuthbert. (1990). A novel method for culturing sweat gland epithelia: comparison of normal and cystic fibrosis tissues. *Br J Clin Pharmacol*, 29(2), 235-238.
- Brayden, Cuthbert, & Lee. (1988). Human eccrine sweat gland epithelial cultures express ductal characteristics. *J Physiol*, 405, 657-675.
- Brohem, Cardeal, Tiago, Soengas, Barros, & Maria-Engler. (2011). Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24(1), 35-50.
- Brown, Katsura, Kawashima, Verkman, & Sabolic. (1995). Cellular distribution of the aquaporins: a family of water channel proteins. *Histochem Cell Biol*, 104(1), 1-9.
- Cantaloube, Raymond-Letron, & Regnier. (2004). Multiple eyelid apocrine hidrocystomas in two Persian cats. *Vet Ophthalmol*, 7(2), 121-125.
- Capiod. (2011). Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie*, 93(12), 2075-2079.
- Chalmers, & Keele. (1952). The nervous and chemical control of sweating. *Br J Dermatol*, 64(2), 43-54.
- Chan, Zhang, Ho, Chiu, Jung, & Leong. (2013). Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. *Sci Rep*, 3, 3462.
- Concepcion, & Feske. (2016). Regulation of epithelial ion transport in exocrine glands by store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell Calcium*.
- Concepcion, Vaeth, Wagner, Eckstein, Hecht, Yang, et al. (2016). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry regulates Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels and eccrine sweat gland function. *J Clin Invest*, 126(11), 4303-4318.
- Cooper, & Hausmann. (2003). *The Cell: A Molecular Approach*. (2 ed.): Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cui, Childress, Piao, Michel, Johnson, Kunisada, et al. (2012). Forkhead transcription factor FoxA1 regulates sweat secretion through Bestrophin 2 anion channel and Na-K-Cl cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(4), 1199-1203.

- Cui, Ishii, Campbell, Michel, Piao, Kume, *et al.* (2017). Foxc1 Ablated Mice Are Anhidrotic and Recapitulate Features of Human Miliaria Sweat Retention Disorder. *J Invest Dermatol*, 137(1), 38-45.
- Cui, & Schlessinger. (2015). Eccrine sweat gland development and sweat secretion. *Exp Dermatol*, 24(9), 644-650.
- Cui, Yin, Sima, Childress, Michel, Piao, *et al.* (2014). Involvement of Wnt, Eda and Shh at defined stages of sweat gland development. *Development*, 141(19), 3752-3760.
- Cui, Piao, Campbell, Ishii, Michel, Sharov, *et al.* (2017). miRNAs are required for post-induction stage sweat gland development. *J Invest Dermatol*.
- Cuthbert, Brayden, Dunne, Smyth, & Wallwork. (1990). Altered sensitivity to amiloride in cystic fibrosis. Observations using cultured sweat glands. *Br J Clin Pharmacol*, 29(2), 227-234.
- Czifra, Szollosi, Toth, Demaude, Bouez, Breton, *et al.* (2012). Endocannabinoids regulate growth and survival of human eccrine sweat gland-derived epithelial cells. *J Invest Dermatol*, 132(8), 1967-1976.
- Das, Safferling, Rausch, Grabe, Boehm, & Spatz. (2015). A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells. *Nat Cell Biol*, 17(3), 276-287.
- Dekkers, Wiegerinck, de Jonge, Bronsveld, Janssens, de Winter-de Groot, *et al.* (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med*, 19(7), 939-945.
- Denda, Tsutsumi, & Denda. (2010). Topical application of TRPM8 agonists accelerates skin permeability barrier recovery and reduces epidermal proliferation induced by barrier insult: role of cold-sensitive TRP receptors in epidermal permeability barrier homeostasis. *Exp Dermatol*, 19(9), 791-795.
- Desroches, Zhang, Choi, King, Maldonado, Li, *et al.* (2012). Functional scaffold-free 3-D cardiac microtissues: a novel model for the investigation of heart cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(10), H2031-2042.
- Diekmann, Alili, Scholz, Giesen, Holtkotter, & Brenneisen. (2016). A three-dimensional skin equivalent reflecting some aspects of in vivo aged skin. *Exp Dermatol*, 25(1), 56-61.
- DiNuzzo, Mangia, Maraviglia, & Giove. (2013). Regulatory mechanisms for glycogenolysis and K<sup>+</sup> uptake in brain astrocytes. *Neurochem Int*, 63(5), 458-464.
- Draelos. (2001). Antiperspirants and the hyperhidrosis patient. *Dermatologic Therapy*, 14, 220-224.
- Du, Lin, Yang, Chen, & Tu. (2016). Overexpression of AQP5 Was Detected in Axillary Sweat Glands of Primary Focal Hyperhidrosis Patients. *Dermatology*, 232(2), 150-155.
- Edmondson, Broglie, Adcock, & Yang. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*, 12(4), 207-218.
- Ertongur-Fauth, Hochheimer, Buescher, Rapprich, & Krohn. (2014). A novel TMEM16A splice variant lacking the dimerization domain contributes to calcium-activated chloride secretion in human sweat gland epithelial cells. *Exp Dermatol*, 23(11), 825-831.
- Forsythe, Kogut, McConville, Fu, McCauley, Halayko, *et al.* (2002). Structure and transcription of the human m3 muscarinic receptor gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26(3), 298-305.

- Foty. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*(51).
- Frey, Misun, Fluri, Hengstler, & Hierlemann. (2014). Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. *Nat Commun*, 5, 4250.
- Fukada, Kamoshida, Kurokawa, Yoshida, Fujita-Yamaguchi, & Nakata. (2014). Migration of breast cancer cells into reconstituted type I collagen gels assessed via a combination of frozen sectioning and azan staining. *BioScience Trends*, 8(4), 212-216.
- Gao, Li, Zhang, Bai, Chi, Liu, *et al.* (2014). Isolation, culture and phenotypic characterization of human sweat gland epithelial cells. *Int J Mol Med*, 34(4), 997-1003.
- Gonzalez Moles, Esteban, Ruiz-Avila, Gil Montoya, Brener, Bascones-Martinez, *et al.* (2009). A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus. *Oral Dis*, 15(2), 162-169.
- Grant, Landis, & Siegel. (1991). The molecular and pharmacological properties of muscarinic cholinergic receptors expressed by rat sweat glands are unaltered by denervation. *J Neurosci*, 11(12), 3763-3771.
- Guillard, Fauconneau, Favreau, Marraud, & Pineau. (2012). An analytical procedure for the determination of aluminum used in antiperspirants on human skin in Franz diffusion cell. *Toxicol Mech Methods*, 22(3), 205-210.
- Gutierrez, Lindeboom, Ferreira, Drissen, Grosveld, Whyatt, *et al.* (2005). A hanging drop culture method to study terminal erythroid differentiation. *Exp Hematol*, 33(10), 1083-1091.
- Hanukoglu, Boggula, Vaknine, Sharma, Kleyman, & Hanukoglu. (2017). Expression of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in the human epidermis and epidermal appendages. *Histochem Cell Biol*.
- Henderson, & Cuthbert. (1991). A high-conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel in cultured human eccrine sweat gland cells. *Pflugers Arch*, 418(3), 271-275.
- Hertz, Xu, Song, Yan, Gu, & Peng. (2013). Astrocytic and neuronal accumulation of elevated extracellular K<sup>+</sup> with a 2/3 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> flux ratio-consequences for energy metabolism, osmolarity and higher brain function. *Front Comput Neurosci*, 7, 114.
- Hibbs. (1958). The fine structure of human eccrine sweat glands. *Am J Anat*, 103(2), 201-217.
- Huang, Zhen, Yin, Ma, & Zhang. (2016). Shh promotes sweat gland cell maturation in three-dimensional culture. *Cell Tissue Bank*, 17(2), 317-325.
- Huch, & Koo. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development*, 142(18), 3113-3125.
- Hurley. (2001). The eccrine sweat glands: structure and function. In Freinkel & Woodley (Eds.), *The Biology of the Skin*. (III ed., pp. 47-76).
- Hwang, & Kirk. (2013). The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(1), a009498.
- Ikeda, Kobayashi, Suzuki, Miyata, Takeuchi, Yamada, *et al.* (2002). M(3) receptor antagonism by the novel antimuscarinic agent solifenacin in the urinary bladder and salivary gland. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 366(2), 97-103.
- Ilantzis, DeMarte, Screatton, & Stanners. (2002). Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*, 4(2), 151-163.
- Ishikawa, Eguchi, Skowronski, & Ishida. (1998). Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via

- cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(3), 835-840.
- Ishikawa, & Ishida. (2000). Aquaporin water channel in salivary glands. *Jpn J Pharmacol*, 83(2), 95-101.
- Jablonski. (2004). The Evolution of Human Skin and Skin Color. *Annual Review of Anthropology*, 33, 585-623.
- Jastrow. (2014, zuletzt abgerufen am 12.04.2017). Färbemethoden in der Histologie - 1. Standardfärbungen. Retrieved from [www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/Histology/Faerbungen.html](http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/Histology/Faerbungen.html)
- Kim, An, Woo, Han, Kim, Jang, *et al.* (2013). Engraftment potential of spheroid-forming hepatic endoderm derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 22(12), 1818-1829.
- Kitchen, Oberg, Sjöhamn, Hedfalk, Bill, Conner, *et al.* (2015). Plasma Membrane Abundance of Human Aquaporin 5 Is Dynamically Regulated by Multiple Pathways. *PLoS One*, 10(11), e0143027.
- Kleinman, & Martin. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15(5), 378-386.
- Ko, O'Dowd, Pediani, Bovell, Elder, Jenkinson, *et al.* (1994). Extracellular ATP can activate autonomic signal transduction pathways in cultured equine sweat gland epithelial cells. *J Exp Biol*, 190, 239-252.
- Kreyden, & Scheidegger. (2004). Anatomy of the sweat glands, pharmacology of botulinum toxin, and distinctive syndromes associated with hyperhidrosis. *Clin Dermatol*, 22(1), 40-44.
- Krupkova, Loja, Redova, Neradil, Zitterbart, Sterba, *et al.* (2011). Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors. *Tumour Biol*, 32(4), 631-639.
- Kruse, Hu, Pan, Arlow, Rosenbaum, Rosemond, *et al.* (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482(7386), 552-556.
- Kruse, Paus, Kloepper, & Stang. (abgerufen am 26.02.2017). Human skin organ culture for analyzing wound healing mechanisms in vitro. Retrieved from <http://www.emb.fraunhofer.de/content/dam/emb/de/documents/flyer/Flyer-Wound-Healing-Fraunhofer-EMB.pdf>
- Kumazawa, Sobue, Mitsuma, & Ogawa. (1994). Modulatory effects of calcitonin gene-related peptide and substance P on human cholinergic sweat secretion. *Clin Auton Res*, 4(6), 319-322.
- Kurata, Futaki, Nakano, Tanemura, Murota, Katayama, *et al.* (2014). Isolation and characterization of sweat gland myoepithelial cells from human skin. *Cell Struct Funct*, 39(2), 101-112.
- Kurzen, Berger, Jager, Hartschuh, Naher, Gratchev, *et al.* (2004). Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. *J Invest Dermatol*, 123(5), 937-949.
- Laden. (1999). Antiperspirants and Deodorants: History of Major HBA Market. In Laden (Ed.), *Antiperspirants and Deodorants* (2 ed., Vol. 20, pp. 1-16): Marcel Dekker Inc.
- Lai-Cheong, & Mc Grath. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 37(5), 223-226.
- Landis. (1999). Development of muscarinic receptors and regulation of secretory responsiveness in rodent sweat glands. *Life Sci*, 64(6-7), 381-385.
- Langbein, Cribier, Schirmacher, Praetzel-Wunder, Peltre, & Schweizer. (2008). New concepts on the histogenesis of eccrine neoplasia from keratin expression in

- the normal eccrine gland, syringoma and poroma. *Br J Dermatol*, 159(3), 633-645.
- Lee. (1954). Physiological gustatory sweating in a warm climate. *J Physiol*, 124(3), 528-542.
- Lee, & Dessi. (1989). NCL-SG3: a human eccrine sweat gland cell line that retains the capacity for transepithelial ion transport. *J Cell Sci*, 92 ( Pt 2), 241-249.
- Lei, Liu, Wu, Lu, & Yang. (2011). Matrigel-induced tubular morphogenesis of human eccrine sweat gland epithelial cells. *Anat Rec (Hoboken)*, 294(9), 1525-1531.
- Lei, Wu, Lu, & Zhu. (2008). Effects of acetylcholine chloride on intracellular calcium concentration of cultured sweat gland epithelial cells. *Arch Dermatol Res*, 300(7), 335-341.
- Leonardo, Volante, Barbareschi, Cavazza, Dei Tos, Bussolati, et al. (2007). Cell membrane reactivity of MIB-1 antibody to Ki67 in human tumors: fact or artifact? *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 15(2), 220-223.
- Levy, Terenghi, Gu, Abraham, Springall, & Polak. (1992). Immunohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin: relationship to tests of neurological function. *Diabetologia*, 35(9), 889-897.
- Li, Chen, Zeng, Li, Zhang, Lin, et al. (2015). Matrigel basement membrane matrix induces eccrine sweat gland cells to reconstitute sweat gland-like structures in nude mice. *Exp Cell Res*, 332(1), 67-77.
- Li, Chen, Zhang, Tang, & Fu. (2013). Three-dimensional culture and identification of human eccrine sweat glands in matrigel basement membrane matrix. *Cell Tissue Res*, 354(3), 897-902.
- Li, Li, Zhang, Chen, & Zhang. (2017). Cell proliferation and differentiation during the three dimensional reconstitution of eccrine sweat glands. *J Mol Histol*.
- Li, Zhang, Chen, Zhang, & Zhang. (2017). Expression of S100A2 and S100P in human eccrine sweat glands and their application in differentiating secretory coil-like from duct-like structures in the 3D reconstituted eccrine sweat spheroids. *J Mol Histol*.
- Louie, Fujii, Meade, & Kenny. (2016). The roles of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, NKCC, and K<sup>+</sup> channels in regulating local sweating and cutaneous blood flow during exercise in humans in vivo. *Physiol Rep*, 4(22).
- Lu, & Fuchs. (2014). Sweat gland progenitors in development, homeostasis, and wound repair. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(2).
- Lu, Hasse, Bodo, Rose, Funk, & Paus. (2007). Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Exp Dermatol*, 16(1), 37-44.
- Lu, Polak, Keyes, & Fuchs. (2016). Spatiotemporal antagonism in mesenchymal-epithelial signaling in sweat versus hair fate decision. *Science*, 354(6319).
- Lu, Polak, Rocha, Pasolli, Chen, Sharma, et al. (2012). Identification of stem cell populations in sweat glands and ducts reveals roles in homeostasis and wound repair. *Cell*, 150(1), 136-150.
- Lumpkin, & Caterina. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, 445(7130), 858-865.
- MacNeil. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874-880.
- Maione, Brudno, Stojadinovic, Park, Smith, Tellechea, et al. (2015). Three-dimensional human tissue models that incorporate diabetic foot ulcer-derived fibroblasts mimic in vivo features of chronic wounds. *Tissue Eng Part C Methods*, 21(5), 499-508.

- Maksimovic, Nakatani, Baba, Nelson, Marshall, Wellnitz, *et al.* (2014). Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature*, 509(7502), 617-621.
- Marte, Finkelstein, & Anson. (2007). Introduction Skin Biology. *Nature*, 445(833).
- Martin. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81.
- Mayoclinic.org. (abgerufen am 09.05.2017). Diseases and Conditions: Hyperhidrosis. Retrieved from <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hyperhidrosis/multimedia/sweat-glands/img-20007980>
- Mazzoleni, Di Lorenzo, & Steimberg. (2009). Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr*, 4(1), 13-22.
- Metze, Bhardwaj, Amann, Eades-Perner, Neumaier, Wagener, *et al.* (1996). Glycoproteins of the carcinoembryonic antigen (CEA) family are expressed in sweat and sebaceous glands of human fetal and adult skin. *J Invest Dermatol*, 106(1), 64-69.
- Montgomery, Jenkinson, Elder, Czarnecki, & MacKie. (1984). The effects of thermal stimulation on the ultrastructure of the human atrichial sweat gland. I. The fundus. *Br J Dermatol*, 110(4), 385-397.
- Montgomery, Jenkinson, Elder, Czarnecki, & MacKie. (1985). The effects of thermal stimulation on the ultrastructure of the human atrichial sweat gland. II. The duct. *Br J Dermatol*, 112(2), 165-177.
- Mork, von Euler, Roomans, & Ring. (1996). cAMP-induced chloride transport in NCL-SG3 sweat gland cells. *Acta Physiol Scand*, 157(1), 21-32.
- Moulton, & Fryer. (2011). Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *Br J Pharmacol*, 163(1), 44-52.
- Mulisch, & Welsch. (2010). *Mikroskopische Technik* (18 ed.): Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Nagel, Rohr, Weber, Kier, Siemers, Kruse, *et al.* (2013). Multipotent nestin-positive stem cells reside in the stroma of human eccrine and apocrine sweat glands and can be propagated robustly in vitro. *PLoS One*, 8(10), e78365.
- Namba, Togo, Tulafu, Kadoya, Nagahama, Taka, *et al.* (2017). Combination of glycopyrronium and indacaterol inhibits carbachol-induced ERK5 signal in fibrotic processes. *Respir Res*, 18(1), 46.
- Nejsum, Kwon, Jensen, Fumagalli, Frokiaer, Krane, *et al.* (2002). Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 511-516.
- Nejsum, Praetorius, & Nielsen. (2005). NKCC1 and NHE1 are abundantly expressed in the basolateral plasma membrane of secretory coil cells in rat, mouse, and human sweat glands. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(2), C333-340.
- Nelson. (2009). Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(1), a000513.
- Nieß. (2010). Thermoregulation und körperliche Aktivität. In Dickhuth, Mayer, Röcker, & Berg (Eds.), *Sportmedizin für Ärzte* (2. ed., pp. 529-541): Deutscher Ärzte-Verlag Köln.
- Noel, Pierard-Franchimont, Pierard, & Quatresooz. (2012). Sweaty skin, background and assessments. *Int J Dermatol*, 51(6), 647-655.
- Oenema, Smit, Smedinga, Racke, Halayko, Meurs, *et al.* (2012). Muscarinic receptor stimulation augments TGF-beta1-induced contractile protein expression by airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303(7), L589-597.

- Okuyama, Kondo, Sato, Endo, Nakajima, Piulats, *et al.* (2016). Dynamic Change of Polarity in Primary Cultured Spheroids of Human Colorectal Adenocarcinoma and Its Role in Metastasis. *Am J Pathol*, 186(4), 899-911.
- Overeem, Bryant, & van. (2015). Mechanisms of apical-basal axis orientation and epithelial lumen positioning. *Trends Cell Biol*, 25(8), 476-485.
- Papadimitropoulos, Piccinini, Brachat, Braccini, Wendt, Barbero, *et al.* (2014). Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS One*, 9(7), e102359.
- Petschnik, Klatte, Evers, Kruse, Paus, & Danner. (2010). Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br J Dermatol*, 162(2), 380-383.
- Pontiggia, Biedermann, Bottcher-Haberzeth, Oliveira, Braziulis, Klar, *et al.* (2014). De novo epidermal regeneration using human eccrine sweat gland cells: higher competence of secretory over absorptive cells. *J Invest Dermatol*, 134(6), 1735-1742.
- Quinton. (1981). Effects of some ion transport inhibitors on secretion and reabsorption in intact and perfused single human sweat glands. *Pflugers Arch*, 391(4), 309-313.
- Quinton. (1983). Sweating and its disorders. *Annu Rev Med*, 34, 429-452.
- Quinton. (2010). Role of epithelial HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299(6), C1222-1233.
- Quinton, Elder, McEwan Jenkinson, & Bovell. (1999). Structure and Function of Human Sweat Glands. Antiperspirants and Deodorants (Vol. 2nd ed., pp. 17-51).
- Reddy, Light, & Quinton. (1999). Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) requires CFTR Cl<sup>-</sup> channel function. *Nature*, 402(6759), 301-304.
- Reijnders, van Lier, Roffel, Kramer, Scheper, & Gibbs. (2015). Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Eng Part A*, 21(17-18), 2448-2459.
- Ring, & Mork. (1997). Electrophysiological responses to oxytocin and ATP in monolayers of a human sweat gland cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 234(1), 30-34.
- Ring, Mork, & Roomans. (1995). Calcium-activated chloride fluxes in cultured NCL-SG3 sweat gland cells. *Cell Biol Int*, 19(4), 265-278.
- Russo. (2015). Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 55, 533-552.
- Saga. (2002). Structure and function of human sweat glands studied with histochemistry and cytochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, 37(4), 323-386.
- Saint-Criq, & Gray. (2017). Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*, 74(1), 93-115.
- Salas, Forteza, & Mashukova. (2016). Multiple roles for keratin intermediate filaments in the regulation of epithelial barrier function and apico-basal polarity. *Tissue Barriers*, 4(3), e1178368.
- Samuelson, & Metzger. (2006). Differentiation of Embryonic Stem (ES) Cells Using the Hanging Drop Method. *CSH Protoc*, 2006(2).
- Sato. (1977). The physiology, pharmacology, and biochemistry of the eccrine sweat gland. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 79, 51-131.
- Sato, & Dobson. (1973). Glucose metabolism of the isolated eccrine sweat gland. II. The relation between glucose metabolism and sodium transport. *J Clin Invest*, 52(9), 2166-2174.

- Sato, Kang, Saga, & Sato. (1989). Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *J Am Acad Dermatol*, 20(4), 537-563.
- Sato, Leidal, & Sato. (1987). Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *Am J Physiol*, 252(1 Pt 2), R166-180.
- Sato, Ohtsuyama, & Samman. (1991). Eccrine sweat gland disorders. *J Am Acad Dermatol*, 24(6 Pt 1), 1010-1014.
- Sato, & Sato. (1981). Pharmacologic responsiveness of isolated single eccrine sweat glands. *Am J Physiol*, 240(1), R44-51.
- Sato, & Sato. (1983). Cholinergic potentiation of isoproterenol-induced cAMP level in sweat gland. *Am J Physiol*, 245(3), C189-195.
- Sato, & Sato. (1987a). Effect of VIP on sweat secretion and cAMP accumulation in isolated simian eccrine glands. *Am J Physiol*, 253(6 Pt 2), R935-941.
- Sato, & Sato. (1987b). Sweat secretion by human axillary apoeccrine sweat gland in vitro. *Am J Physiol*, 252(1 Pt 2), R181-187.
- Schiefferdecker. (1922). Die Hautdrüsen des Menschen und der Säugetiere, ihre biologische und rassenanatomische Bedeutung, sowie die Muscularis sexualis. *Zoologica*, 27(72).
- Schittek, Hipfel, Sauer, Bauer, Kalbacher, Stevanovic, *et al.* (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*, 2(12), 1133-1137.
- Schmitz. (2011). *Der Experimentator Zellkultur* (3 ed.). Spektrum Verlag.
- Scholzen, & Gerdes. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3), 311-322.
- Schon, Benwood, O'Connell-Willstaedt, & Rheinwald. (1999). Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 12), 1925-1936.
- Servetnyk, & Roomans. (2007). Chloride transport in NCL-SG3 sweat gland cells: channels involved. *Exp Mol Pathol*, 83(1), 47-53.
- Shamir, & Ewald. (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(10), 647-664.
- Srinivasan, Kolli, Esch, Abaci, Shuler, & Hickman. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*, 20(2), 107-126.
- Streker, & Kerscher. (2012). [Antiperspirants for the therapy of focal hyperhidrosis]. *Hautarzt*, 63(6), 452-455.
- Sugiura, Tazuke, Ueno, Sugiura, Kato, Miyahira, *et al.* (2015). Effect of prolactin-induced protein on human skin: new insight into the digestive action of this aspartic peptidase on the stratum corneum and its induction of keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol*, 135(3), 776-785.
- Tharakan, Pontiggia, Biedermann, Bottcher-Haberzeth, Schiestl, Reichmann, *et al.* (2010). Transglutaminases, involucrin, and loricrin as markers of epidermal differentiation in skin substitutes derived from human sweat gland cells. *Pediatr Surg Int*, 26(1), 71-77.
- Theveneau, & Mayor. (2013). Collective cell migration of epithelial and mesenchymal cells. *Cell Mol Life Sci*, 70(19), 3481-3492.
- Thoma, Stroebel, Rosch, Calpe, Krek, & Kelm. (2013). A high-throughput-compatible 3D microtissue co-culture system for phenotypic RNAi screening applications. *J Biomol Screen*, 18(10), 1330-1337.
- Thoma, Zimmermann, Agarkova, Kelm, & Krek. (2014). 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev*, 69-70, 29-41.

- Thomas, Messam, Spengler, Biedler, & Ross. (2004). Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 279(27), 27994-27999.
- Tiede, Kloepper, Ernst, Poeggeler, Kruse, & Paus. (2009). Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J Invest Dermatol*, 129(11), 2711-2720.
- Toth, Olah, Szollosi, & Biro. (2014). TRP channels in the skin. *Br J Pharmacol*, 171(10), 2568-2581.
- Tracy, Minasian, & Caterson. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 5(3), 119-136.
- Trapnell, Williams, Pertea, Mortazavi, Kwan, van Baren, et al. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 28(5), 511-515.
- Tsukada, Kouki, Fujiwara, Ramadhani, Horiguchi, Kikuchi, et al. (2013). Reassembly of anterior pituitary organization by hanging drop three-dimensional cell culture. *Acta Histochem Cytochem*, 46(4), 121-127.
- Tucker, Headon, Schneider, Ferguson, Overbeek, Tschopp, et al. (2000). Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development*, 127(21), 4691-4700.
- Turner, Gold, Schnoll, & Blendy. (2013). Translational research in nicotine dependence. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(3), a012153.
- Uno. (1977). Sympathetic innervation of the sweat glands and piloerector muscles of macaques and human beings. *J Invest Dermatol*, 69(1), 112-120.
- van Griensven, Zeichen, Tschernig, Seekamp, & Pape. (2002). A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. *Exp Toxicol Pathol*, 54(1), 25-29.
- Velez-delValle, Marsch-Moreno, Castro-Munozledo, Galvan-Mendoza, & Kuri-Harcuch. (2016). Epithelial cell migration requires the interaction between the vimentin and keratin intermediate filaments. *Sci Rep*, 6, 24389.
- Venus, Waterman, & Mc Nab. (2011). Basic physiology of the skin. *Surgery*, 29(10), 471-474.
- Vilches, Wynick, Kofler, Lang, & Navarro. (2012). Sudomotor function and sweat gland innervation in galanin knockout mice. *Neuropeptides*, 46(4), 151-155.
- Watabe, Sugawara, Kikuchi, Yamasaki, Sakai, & Aiba. (2013). Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. *J Dermatol Sci*, 72(2), 177-182.
- Welss, Basketter, & Schroder. (2004). In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro*, 18(3), 231-243.
- Wickett, & Visscher. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34(10), S98-S110.
- Wilke, Martin, Terstegen, & Biel. (2007). A short history of sweat gland biology. *Int J Cosmet Sci*, 29(3), 169-179.
- Wilke, Wepf, Keil, Wittern, Wenck, & Biel. (2006). Are sweat glands an alternate penetration pathway? Understanding the morphological complexity of the axillary sweat gland apparatus. *Skin Pharmacol Physiol*, 19(1), 38-49.
- Wilson, Ko, Padiani, Rakhit, Nichol, & Bovell. (1995). Calcium-dependent regulation of membrane ion permeability in a cell line derived from the equine sweat gland epithelium. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 111(2), 215-221.
- Wilson, Whiteford, Bovell, Padiani, Ko, Smith, et al. (1994). The regulation of membrane  $^{125}\text{I}^-$  and  $^{86}\text{Rb}^+$  permeability in a virally transformed cell line (NCL-

- SG3) derived from the human sweat gland epithelium. *Exp Physiol*, 79(3), 445-459.
- Wolff. (2009). Einführung in die Dermopathologie. Pathologie (pp. 607-611): Springer Berlin Heidelberg.
- Xu, Song, Xue, Gu, Hertz, & Peng. (2013). Requirement of glycogenolysis for uptake of increased extracellular K<sup>+</sup> in astrocytes: potential implications for K<sup>+</sup> homeostasis and glycogen usage in brain. *Neurochem Res*, 38(3), 472-485.
- Zancanaro, Merigo, Crescimanno, Orlandini, & Osculati. (1999). Immunohistochemical evidence suggests intrinsic regulatory activity of human eccrine sweat glands. *J Anat*, 194 ( Pt 3), 433-444.
- Zanoni, Piccinini, Arienti, Zamagni, Santi, Polico, *et al.* (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*, 6, 19103.
- Zeng, Leyden, Brand, Spielman, McGinley, & Preti. (1992). An investigation of human apocrine gland secretion for axillary odor precursors. *J Chem Ecol*, 18(7), 1039-1055.
- Zhang, Ott, Lewandowska, Leir, & Harris. (2012). Molecular mechanisms controlling CFTR gene expression in the airway. *J Cell Mol Med*, 16(6), 1321-1330.
- Zhang, Zeng, Zhang, Li, Chen, Zhang, *et al.* (2014). Localization of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase alpha/beta, Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-2Cl-cotransporter 1 and aquaporin-5 in human eccrine sweat glands. *Acta Histochem*, 116(8), 1374-1381.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Haut und Hautanhangsgebilde. ....	1
Abbildung 2: Morphologie der ekkrinen Schweißdrüse.....	8
Abbildung 3: Ca <sup>2+</sup> -Signalling in Zellen des sezernierenden Coils. ....	11
Abbildung 4: Sekretionsmechanismus in sezernierenden Zellen des Coils. ....	14
Abbildung 5: Herstellung von 3D Modellen mittels <i>Hanging drop</i> -Technologie. ....	41
Abbildung 6: Zeitraffermikroskopie auswachsender Coil- und Dukt-Zellen aus einer <i>in situ</i> Schweißdrüse mit Coil- und Dukt-Kompartiment. ....	58
Abbildung 7: Zeitraffermikroskopie auswachsender Coil-Zellen aus einem <i>in situ</i> Coil-Kompartiment. ....	59
Abbildung 8: Zeitraffermikroskopie auswachsender Dukt-Zellen aus einem <i>in situ</i> Dukt-Kompartiment. ....	59
Abbildung 9: Charakterisierung von Schweißdrüsenzellen anhand des TEER.....	61
Abbildung 10: Morphologische Untersuchung von Schweißdrüsenzellen in der 2D Kultur und in 3D Modellen. ....	62
Abbildung 11: Analyse des Sphärendurchmessers von 3D Modellen der Schweißdrüse.....	64
Abbildung 12: Histologische HE- und Azan-Färbung von Paraffinschnitten der 3D Modelle.....	65
Abbildung 13: Methodisches Vorgehen zur Analyse der Viabilität von 3D Modellen.....	68
Abbildung 14: Analyse der Viabilität in 3D Co-Kultur Modellen mittels Live-Dead Assay.....	70
Abbildung 15: Analyse der Viabilität in 3D Coil-Modellen mittels Live-Dead Assay..	71
Abbildung 16: Analyse der Viabilität in 3D Dukt-Modellen mittels Live-Dead Assay.	72
Abbildung 17: Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 2D Kulturen und in 3D Modellen.....	76
Abbildung 18: Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in Abhängigkeit zur Kultivierungsdauer und Spendervariabilität in 3D Modellen.....	78
Abbildung 19: Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in nativen Drüsen, in der 2D Kultur und in 3D Co-Kultur Modellen mittels Immunfluoreszenz..	83
Abbildung 20: Proteinexpression weiterer Schweißdrüsen-spezifischer Marker in nativen Drüsen, in der 2D Kultur und in 3D Co-Kultur Modellen mittels Immunfluoreszenz. ....	85

Abbildung 21: Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Co-Kultur Modellen, in 3D Coil-Modellen und in 3D Dukt-Modellen mittels Immunfluoreszenz.	88
Abbildung 22: Identifikation von Subzelltypen anhand spezifischer Marker in 3D Modellen mittels Immunfluoreszenz. ....	90
Abbildung 23: Co-Lokalisation von <i>clear cells</i> und <i>dark cells</i> in 3D Modellen mittels Immunfluoreszenz. ....	92
Abbildung 24: Proteinexpressionsanalyse von Zellpopulationen in ekkrinen Schweißdrüsenzellen mittels Durchflusszytometrie. ....	95
Abbildung 25: Apikal-basale Polarität in 3D Co-Kultur Modellen der Schweißdrüse.	97
Abbildung 26: Einfluss von ACh auf die Viabilität von 3D Modellen. ....	99
Abbildung 27: Quantifizierung der Fluoreszenzfarbstoffe Calcein und EthD-1 im Live-Dead Assay von ACh-stimulierten 3D Modellen. ....	100
Abbildung 28: Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Modellen nach cholinergem Stimulation mittels NGS-Analyse. ....	102
Abbildung 29: Genexpression spezifischer Marker der Subzelltypen der Schweißdrüse in 3D Modellen nach cholinergem Stimulation mittels NGS-Analyse. ....	103
Abbildung 30: Einfluss von ACh auf die Genexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Modellen der humanen Schweißdrüse. ....	106
Abbildung 31: Einfluss von ACh auf die Proteinexpression Schweißdrüsen-spezifischer Marker in 3D Co-Kultur Modellen. ....	108
Abbildung 32: Nachweis von AQP5 in der 2D Kultur sowie im 3D Co-Kultur Modell mittels Western Blot-Analyse. ....	110
Abbildung 33: Intrazellulärer $Ca^{2+}$ -Einstrom in der 2D Co-Kultur und in 3D Co-Kultur Modellen. ....	114
Abbildung 34: Integration von 3D Co-Kultur Modellen in ein <i>in vitro</i> Phenion-Vollhautmodell. ....	117
Abbildung 35: Zusammenfassendes Schema des ekkrinen Sekretionsmechanismus in einer sezernierenden Schweißdrüsenzelle. ....	145
Abbildung 36: Analyse der Zytotoxizität mittels WST-1-Test mit Reagenzien zur cholinergen Stimulation der ekkrinen Schweißdrüsenzellen. ....	xxx
Abbildung 37: Analyse der Zytotoxizität mittels WST-1-Test mit Reagenzien zur Behandlung von ekkrinen Schweißdrüsenzellen. ....	xxxi

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der ekkrinen und apokrinen Schweißdrüse. ....	5
Tabelle 2: Marker zur Identifikation von zellulären Komponenten der humanen ekkrinen Schweißdrüse. ....	22
Tabelle 3: qRT-PCR Primer. ....	34
Tabelle 4: Eingesetzte Primärantikörper. ....	34
Tabelle 5: Sekundärantikörper. ....	35
Tabelle 6: Übersicht der Migrationsfähigkeiten und des Proliferationsverhaltens der ekkrinen Schweißdrüsenzellen aus der nativen Schweißdrüse. ....	60
Tabelle 7: Differenzierung von Gewebestrukturen in 3D Modellen der Schweißdrüse mittels histologischer Azan-Färbung. ....	67
Tabelle 8: Identifikation von ekkrinen Schweißdrüsenzellen mithilfe von Schweißdrüsen-spezifischen Markern. ....	80
Tabelle 9: Übersicht der Proteinexpressionen nach Immunfluoreszenzfärbung der nativen Schweißdrüse und im 3D Co-Kultur Modell. ....	86
Tabelle 10: Übersicht der Proteinexpressionen nach Immunfluoreszenzfärbung von 3D Modellen. ....	91
Tabelle 11: Übersicht der Genexpressionsänderungen nach cholinergem Stimulation von 3D Modellen. ....	107
Tabelle 12: Stimulation und Inhibition von Ionenkanälen sowie Rezeptoren der ekkrinen Schweißdrüse durch den Einsatz von Agonisten und Antagonisten. ....	112
Tabelle 13: Übersicht der Proteinexpressionen Schweißdrüsen-spezifischer Marker und des prozentualen Anteils der Zellpopulationen in primären Schweißdrüsenzellen mittels Durchflusszytometrie. ....	xxix

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
α-SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
a	apokrine Schweißdrüse
as	<i>antisense</i>
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholin-Esterase
ALI	<i>Air liquid interface</i> , Luft-Flüssigkeits-Grenze
ANO1	Calcium-aktivierter Chloridkanal Anoctamin-1
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AQP5	Aquaporin 5
Best2	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter Anionen-Kanal Bestrophin 2
bp	Basenpaare
CAII	Carboanhydrase II
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CaCC	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter Cl <sup>-</sup> -Kanal
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Ccl	<i>cell membrane capacitance</i> , Membrankapazität
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEACAM5	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CHRM3/mAChR3	<i>muscarinic acetylcholine receptor 3</i> , Muskariner Acetylcholin Rezeptor 3
CK	Cytokeratin
Clic6	<i>Chloride intracellular channel 6</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i>
CTCF	<i>corrected total cell fluorescence</i>
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FoxA1	<i>forkhead transcription factor</i>
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GalR2/GalR3	Galanin Rezeptor 2 bzw. 3

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G (Guanosintriphosphat-bindendes)-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
J	Jahre
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kaliumsulfat
kDa	Kilodalton
Ki67	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki67</i> , Ki67 protein
l	Liter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
MMLV	<i>monolely murine leukemia virus</i> , Murines Leukämievirus
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i> , microRNA
NaCl	Natriumchlorid
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1
nm	Nanometer
NOS-I	Stickstoffmonoxid-Synthase I
OD	optische Dichte
ORAI	<i>calcium release activated channel 1</i>
P	Passage
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potential hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PIP	<i>Prolactin-induced protein</i> , Prolaktin-induziertes Protein
PLC	Phospholipase C
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	<i>sense</i>
S100	Calcium-bindende Proteine
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
sek	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte

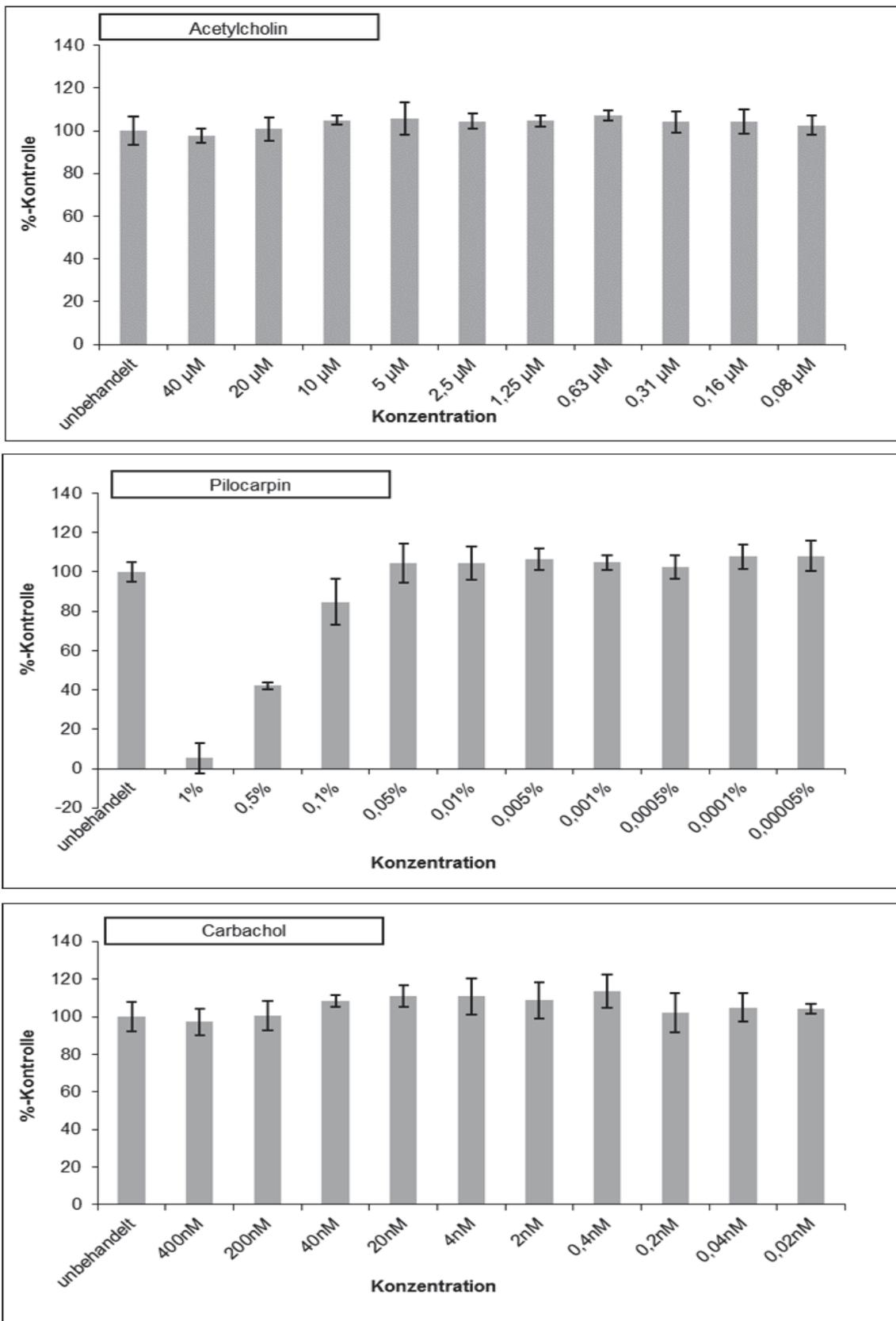
---

TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i> , Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TRPC	<i>transient receptor potential cation channel</i>
TRPM8	<i>transient receptor potential cation channel member 8</i>
U	Units
üN	über Nacht
V	Volt
VIP	Vasoaktives intestinalis Peptid
WST-1	<i>water soluble tetrazolium</i>
Z	Impedanzspektrum
ZF	<i>cystic fibrosis</i> , Zystische Fibrose
ZNS	Zentrales Nervensystem

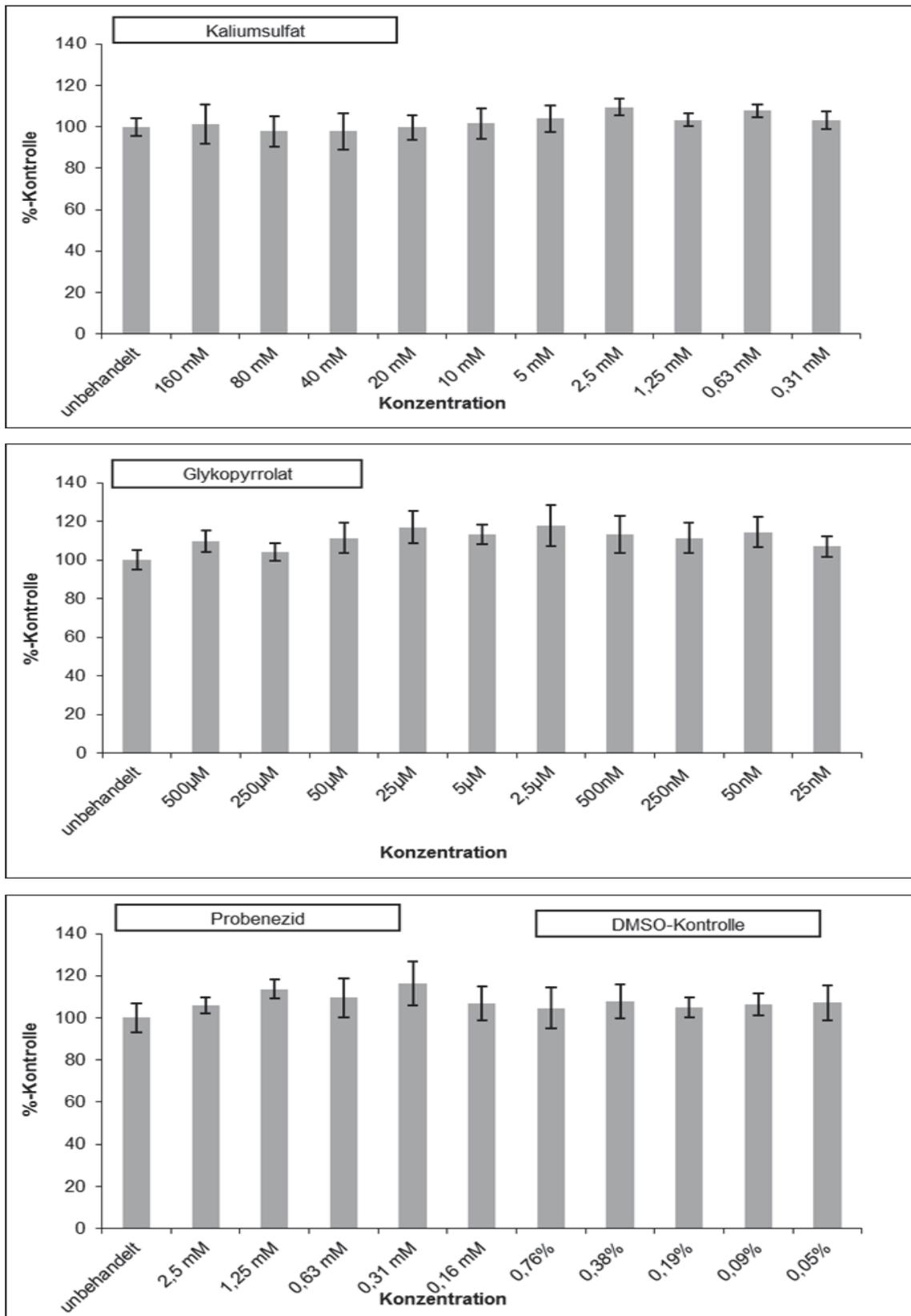
## 7.4 Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

**Tabelle 13: Übersicht der Proteinexpressionen Schweißdrüsen-spezifischer Marker und des prozentualen Anteils der Zellpopulationen in primären Schweißdrüsenzellen mittels Durchflusszytometrie.**

<b>Marker</b>	<b>2D Co-Kultur (in %)</b>	<b>2D Coil-Zellen (in %)</b>	<b>Markierte Zelltypen</b>
CK19	79,7	30,8	Coil + Dukt
CEACAM5	89,7	58,6	Coil + Dukt
CFTR	96,2	36,2	Coil + Dukt
NKCC1	95,7	8,3	Coil + Dukt
CHRM3	61,2	2,1	Coil
ANO1	73,2	1,5	Coil
AQP5	63,0	6,4	Coil
GalR2	91,7	9,6	Nicht bekannt
S100	39,6	28,2	<i>Clear cells</i> (z.T. Myoepithelzellen)
Substance P	7,4	24,0	<i>Clear cells</i>
CGRP	68,7	3,6	<i>Dark cells</i>
$\alpha$ -SMA	32,4	0,8	Myoepithelzellen
CD200	3,1	0,4	Dukt-Zellen
Nestin	95,4	40,8	Stammzellen



**Abbildung 36: Analyse der Zytotoxizität mittels WST-1-Test mit Reagenzien zur cholinergen Stimulation der ekkrinen Schweißdrüsenzellen.** Anhand des WST-1-Tests wurde die Vitalität der Zellen (in %) und damit die Zytotoxizität nach Behandlung mit den Substanzen ACh, Pilocarpin und Carbachol analysiert. Die Bestimmung erfolgte nach Messung der OD bei 450 nm und Kalkulation der Vitalität (siehe 2.2.2.6) mit  $n=6 \pm SD$ .



**Abbildung 37: Analyse der Zytotoxizität mittels WST-1-Test mit Reagenzien zur Behandlung von ekkrinen Schweißdrüsenzellen.** Anhand des WST-1-Tests wurde die Vitalität der Zellen (in %) und damit die Zytotoxizität nach Behandlung mit den Substanzen Kaliumsulfat, Glykopyrrolat und Probenesid (mit Lösungsmittelkontrolle DMSO) analysiert. Die Bestimmung erfolgte nach Messung der OD bei 450 nm und Kalkulation der Vitalität (siehe 2.2.2.6) mit  $n=6 \pm SD$ .

## Danksagungen

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch für die fachliche Erstbetreuung seitens der Universität und die freundliche Zusammenarbeit. Weiterer Dank gilt Prof. Dr. Heinz Mehlhorn für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitbetreuung.

Ich danke Dr. Dirk Petersohn, Dr. Claudia Hundeiker und Dr. Andrea Sättler von der Firma Henkel AG & Co. KGaA für die Möglichkeit, an einem so spannenden Projekt arbeiten zu dürfen und für die Überlassung des Themas zur Durchführung meiner Dissertation. Mein herzlicher Dank gilt auch Melanie Giesen, die das Projekt ins Leben gerufen und mich stets unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thomas Welss, Bernhard Banowski und Sabine Gründl. Ich danke Euch für die fachliche Betreuung, spannende Diskussionen, das tolle Teamwork und das konstruktive Korrekturlesen. Außerdem möchte ich Guido Fuhrmann, Melanie Ludwig, Christoph Backhausen, Gudrun Heinen, Marion Merkel, Werner Bartmann, Kerstin Elias, Swenja Kalischke, Nelli Blasius, Claudia Zyntek und allen Mitarbeitern für die herzliche Zusammenarbeit und Eure Hilfe danken. Es war eine sehr schöne Zeit mit Euch.

Weiterhin möchte ich mich auch bei all denen bedanken, die mich auf unterschiedlichste Art und Weise bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben und somit zum Gelingen beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die motivierenden Worte und die persönliche Unterstützung in dieser Zeit. Benjamin danke ich von Herzen: Du hast stets an mich geglaubt und mich in jeder Hinsicht unterstützt.

Danke!