

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
aus der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. W. Lambrecht

Differenzierung von fetalen  
Leberstammzellen und Leberzellen  
der Ratte im Zellkulturmodell

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von  
Helge Bruns  
aus Elmshorn

Hamburg, 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 22.10.2007  
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg  
Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. D. Kluth  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. T. Strate  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. A. Zander

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Leber . . . . .	1
1.1.1	Embryogenese der Leber . . . . .	2
1.1.2	Zelltypen und Stammzellen in der adulten Leber . . . . .	2
1.1.3	Leberzelltypen in der fetalen Leber . . . . .	3
1.1.4	Hämatopoese in der fetalen Leber . . . . .	4
1.2	Dieser Arbeit vorangehende Arbeiten . . . . .	5
1.3	Fragestellung und Ziele dieser Arbeit . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1	Ablauf der Experimente . . . . .	6
2.2	Materialien und Bezugsquellen . . . . .	7
2.2.1	Antikörper . . . . .	7
2.2.2	Sequenzen der verwendeten Primer . . . . .	7
2.2.3	Chemikalien . . . . .	9
2.2.4	Filtermaterial und Verbrauchsmaterialien . . . . .	11
2.2.5	Technische Geräte und Glaswaren . . . . .	12
2.3	Allgemeine Arbeitsmethoden . . . . .	13
2.3.1	Sterilisierung der Arbeitsmaterialien . . . . .	13
2.3.2	EDV . . . . .	13
2.3.3	Zellzählung mittels Trypan-Blau-Methode . . . . .	13
2.4	Lösungen für die Zellisolationen . . . . .	14
2.4.1	Lösungen für die Isolation adulter Hepatozyten . . . . .	14
2.4.2	Lösungen für die Isolation fetaler Hepatozyten . . . . .	14
2.4.3	Dichte des Percoll-Gradienten bei den fetalen Hepatozyten . . . . .	15
2.5	Isolationsprozeduren . . . . .	15
2.5.1	Isolationsprozedur für adulte Hepatozyten . . . . .	15
2.5.2	Isolationsprozedur für fetale Hepatozyten . . . . .	17
2.6	Zellkultur . . . . .	18
2.6.1	Kollagenbeschichtung der Kulturplatten . . . . .	18
2.6.2	Kulturmedien . . . . .	18
2.6.3	Kulturbedingungen . . . . .	19

2.7	Datengewinnung . . . . .	19
2.7.1	Standardisierte Zellzählung . . . . .	19
2.7.2	Untersuchung der Markerexpression auf RNA-Ebene . . . . .	20
2.7.2.1	Isolation von mRNA . . . . .	20
2.7.2.2	Umschreiben der mRNA in cDNA . . . . .	20
2.7.2.3	PCR . . . . .	21
2.7.2.4	Programme Thermocycler . . . . .	21
2.7.2.5	Gel-Elektrophorese . . . . .	22
2.7.3	Untersuchung der Markerexpression auf Proteinebene . . . . .	22
2.7.3.1	Anfertigung von Cytospins . . . . .	22
2.7.3.2	Immunhistochemie . . . . .	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Wachstumskinetik . . . . .	24
3.1.1	Gesammelte Daten aus den Zellkulturen . . . . .	24
3.1.1.1	Wachstumskinetik der adulten Hepatozyten . . . . .	25
3.1.1.2	Zellzahlen der Thy1 positiven fetalen Hepatozyten . . . . .	26
3.1.1.3	Zellzahlen der Thy1 negativen fetalen Hepatozyten . . . . .	27
3.1.2	Auswertung - Tabellarische Zusammenfassung . . . . .	28
3.1.3	Diagramme - Wachstumskinetik der fetalen Hepatozyten . . . . .	28
3.2	Ergebnisse der PCR . . . . .	31
3.2.1	adulte Hepatozyten . . . . .	31
3.2.1.1	Tabellarische Zusammenfassung: PCR der adulten Zellen . . . . .	32
3.2.2	Thy1 negative fetale Hepatozyten . . . . .	33
3.2.3	Thy1 positive fetale Hepatozyten . . . . .	38
3.2.4	Tabellarische Zusammenfassung: PCR der fetalen Zellen . . . . .	41
3.2.4.1	Thy1 negative fetale Hepatozyten . . . . .	41
3.2.4.2	Thy1 positive fetale Hepatozyten . . . . .	41
3.3	Ergebnisse der Immunhistochemie . . . . .	42
3.3.1	adulte Hepatozyten . . . . .	42
3.3.1.1	tabellarische Zusammenfassung . . . . .	42
3.3.2	fetale Hepatozyten . . . . .	43
3.3.2.1	tabellarische Zusammenfassung . . . . .	44

<b>4 Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1 Vergleich der Wachstumskinetik . . . . .	46
4.1.1 fetaler und adulter Hepatozyten . . . . .	46
4.1.2 Thy1 positiver und negativer Hepatozyten . . . . .	46
4.2 Untersuchung der Markerexpression . . . . .	47
4.2.1 der adulten Hepatozyten . . . . .	47
4.2.2 Thy1 positiver und negativer Hepatozyten . . . . .	47
4.3 Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit . . . . .	48
4.4 Antworten auf die formulierten Fragestellungen . . . . .	51
4.5 Sich aus dieser Arbeit ergebende Fragen . . . . .	51
<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>Literatur</b>	<b>56</b>
<b>Danksagung</b>	<b>67</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>68</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Leber

[...]Zeus hielt Wort; er sandte dem Gefesselten einen Adler, der als täglicher Gast an seiner Leber zehren durfte, die sich, abgeweidet, immer wieder erneuerte.

[G.B. Schwab, Prometheus, Tübingen 1838]

Die Leber zeigt als Organ eine erstaunliche Fähigkeit zur Erneuerung, die von der Schwere und Art der Schädigung abhängig ist. An den Regenerationsprozessen sind in unterschiedlichem Maße verschiedene Zelltypen beteiligt. Mehrere von diesen zeigen stammzellähnliche Eigenschaften. Diese Zelltypen sollen im folgenden kurz vorgestellt und im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

Welche Zellen in der fetalen Leber die Vorläuferzellen der verschiedenen Zelltypen der adulten Leber darstellen, ist bisher nicht abschliessend geklärt. Seit langem ist allerdings bekannt, dass die fetale Leber neben den der adulten Leber entsprechenden Aufgaben die tragende Rolle bei der Hämatopoese spielt.

Ein besseres Verständnis der Reparaturvorgänge in der adulten und fetalen Leber könnte eines Tages vielleicht dazu beitragen, einen zumindest vorübergehenden Leberersatz, der aus eigenen Zellen gezüchtet wurde, zur Verfügung zu haben. Bis jetzt ist im Fall schwerster Leberschädigung nur die Möglichkeit einer Lebertransplantation gegeben. Aufgrund der niedrigen Zahl von Spenderorganen, der Möglichkeit von Abstoßungsreaktionen und der Notwendigkeit der Immunsuppression kann dies eine allenfalls unbefriedigende Lösung der Problematik sein. Vor diesem Hintergrund scheint die Forschung an der Entwicklung der Leber und an der Zucht von Leberzellen und eines Tages auch Lebergewebe aus einzelnen Stammzellen nahe liegend und eine Notwendigkeit.



Abbildung 1: Peter Paul Rubens: Gefesselter Prometheus

### 1.1.1 Embryogenese der Leber

In gängigen Theorien geht man bisher davon aus, dass die Leber sich aus den Zellen des embryonalen Vorderdarmes entwickelt. Diese Zellen endodermalen Ursprungs sollen in das mesenchymale Septum transversum auswachsen. [93], [20], [97], [47].

Eine vereinfachte Darstellung der Situation während der Leberentwicklung zeigt die nebenstehende Abbildung. Auf zellulärer Ebene wurden lange Zeit die "Hepatoblasten" als Quelle der Lebervorläuferzellen während der Entwicklung beschrieben [80]. Hierbei handelt es sich um Zellen, bei denen eine bipotente Differenzierungsfähigkeit gezeigt werden konnte. Aus den Hepatoblasten konnten im Laufe der Organogenese entweder Hepatozyten oder Gallengangsepithelzellen werden [76], [71]. Über weitere Zelltypen, die außer Hepatoblasten an der Leberentstehung beteiligt sein könnten, war bislang wenig bekannt.

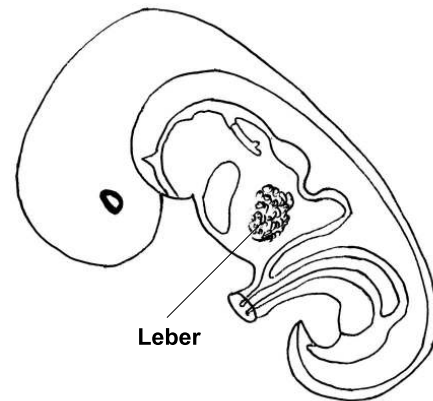


Abbildung 2: Leberentwicklung. Eigene Zeichnung nach Blechschmidt.

### 1.1.2 Zelltypen und Stammzellen in der adulten Leber

Anders als in der fetalen Leber konnten in der adulten verschiedene Zelltypen sicher identifiziert werden, die bei der Regeneration der Leber eine Quelle der Hepatozytenentstehung darstellen können [74], [73]. Die Existenz von Leberstammzellen ist bereits vor fast vierzig Jahren von Wilson et al. diskutiert worden [94]. Die Herkunft dieser Zellen ist bisher nicht abschliessend geklärt worden [16], [5], [87]. Leberstammzellen werden darüberhinaus immer wieder als eine mögliche Therapieoption bei Leberschädigung diskutiert [18], [26], [32].

Eine Zellquelle der Regeneration der Leber stellen die Hepatozyten selbst dar [90], [19]. Serielle Transplantationen von adulten Hepatozyten haben ein ausgeprägtes Proliferationspotenzial dieses Zelltyps gezeigt [65]. Hepatozyten können beispielsweise nach einer partiellen Hepatektomie zur vollständigen Regeneration der Lebermasse beitragen (*uncommitted stem cell*-Konzept) [70], [58], [25], [36]. Einen weiteren Typ von Zellen, die unter bestimmten Bedingungen an der Regeneration der Leber beteiligt sind, stellen die "Oval Cells" dar. Bei diesen handelt es sich um in den Hering-Kanälen befindliche ruhende Stammzellen der Leber [86], [67]. Oval Cells haben eine bipotente Differenzierungsfähigkeit, d.h., sie können Gal-

lengangszellen oder Hepatozyten hervorbringen [68], [42]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen *in vivo* und *in vitro* ein klonales Wachstumspotenzial besitzen [41], [21], [55]. Neuere Daten weisen darüber hinaus auf ein extrahepatisches Kompartiment von Leberstammzellen hin, die sich im Knochenmark oder im peripheren Blut befinden und die unter bestimmten Bedingungen zur Leberregeneration beitragen [66], [84], [2], [100]. Die verschiedenen Typen von Leberzellen der adulten Leber können anhand ihres phänotypischen Markerprofils voneinander unterschieden werden [85], [79], [72]. Oval Cells exprimieren typischer Weise sowohl Lineagemarker der Hepatozyten wie Albumin, AFP und CK-18 [22] als auch hämatopoetische Stammzellmarker wie CD34, c-kit und Thy1 [85], [79], [88], [31], [64], [15]. Zu bedenken ist, dass die erwähnten Typen von Leberzellen alle ein enormes Wachstumspotenzial haben. In verschiedenen Modellen konnten die einzelnen Zelltypen untersucht werden. Da ein Nachweis unter natürlichen Bedingungen äußerst schwierig ist und die adulten Hepatozyten nach partieller Hepatektomie ein zur Leberregeneration ausreichendes Wachstumspotenzial zeigten, war die Existenz der Oval Cell lange Zeit zumindest umstritten. Zu den verwendeten Modellen gehören die bereits erwähnte serielle Transplantation [65] bzw. Regeneration der Leber durch Hepatozyten bei partieller Hepatektomie [70] und auch durch toxische Schädigung mit Tetrachlorkohlenstoff [37] oder Dimethylnitrosamin [74]. Im Modell der zentrolobulären Schädigung und Unterdrückung der Hepatozytenproliferation durch N-2-Acetylaminofluoren zeigte sich eine ductal gelegene bipolare Leberzelle als Ursprung der Leberregeneration. Aus dieser konnten neben Hepatozyten auch Gallengangsepithelzellen hervorgehen [74]. Schließlich ist das Modell der durch Allylalkohol hervorgerufenen periportalen Schädigung ein gängiges Modell. Hierbei zeigte sich eine periductal im Bereich der Heringschen Kanäle gelegene Zelle als Quelle der Leberregeneration. Aufgrund ihrer Form sind diese Zellen als Oval Cells beschrieben worden [23], [81]. *In vitro* zeigen diese Zellen ein klonales Wachstumspotenzial [41], [21] und eine bipotente Entwicklungsfähigkeit [68], [42]. Diese Zelle wurde als möglicher Leberstammzellkandidat beschrieben [74], [96].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschiedenen Zelltypen in noch unbekannter Weise alle an der Leberregeneration unter natürlichen Bedingungen beteiligt sein könnten.

### 1.1.3 Leberzelltypen in der fetalen Leber

Den weitaus größten Anteil von Zellen in der fetalen Leber machen die Hepatoblasten aus [76]. Prinzipiell haben diese die Fähigkeit, sich in Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen zu differenzieren [33], [80], [75]. Neueste Erkenntnisse deuten auf die Existenz zumindest zwei-



er hepatischer Zelllinien bereits in der fetalen Leber hin: Solche, die gleichzeitig Thy1 und CK18 exprimieren und solche, die CK18, aber kein Thy1 exprimieren. Der erstgenannte Zelltyp entspricht damit der phänotypischen Markerexpression der Oval Cells der adulten Leber, der zweite könnte den Hepatoblasten entsprechen. [28]. Thy1 - der auch als CD90 bezeichnet wird - ist unter anderem als Marker hämatopoetischer Zellen bekannt [34], [14], [95], [92], [91]. Während der späten Fetalentwicklung der Leber zeigten diese beiden Zelltypen unterschiedliche Muster der Genexpression. Die Thy1 positiven Zellen zeigten eine Hochregulation der AFP Expression und eine Herabregulation der Expression von Albumin. Demgegenüber zeigten die Thy1 negativen Zellen aus der fetalen Leber eine genau gegensätzliche Kinetik der Markerexpression [28]. Dies könnte einen Hinweis auf eine Reifung der Thy1 negativen Zellen und auf eine Dedifferenzierung der Thy1 positiven Zellen zum Ende der Fetalzeit darstellen. In weiteren Arbeiten wurden Fetal liver epithelial cells (FLEC) beschrieben [50], [17], [62], [13]. Diese Zellen zeigten das Potenzial, sich in alle epithelialen Komponenten der Leber zu differenzieren [69]. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest drei sich im Markerprofil unterscheidende Subpopulationen der FLEC existieren: solche, die AFP und Albumin, aber kein CK-19 exprimieren, solche, die CK-19, aber kein AFP oder Albumin exprimieren und schließlich solche, die alle drei Marker exprimieren [17].

Die Expression von Stammzellmarkern wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht untersucht.

#### 1.1.4 Hämatopoese in der fetalen Leber

Seit langem ist die tragende Rolle der Leber für die Hämatopoese bekannt [57], [6]. Die hepato-lienale Phase der Hämatopoese wird dann später nach und nach durch die myeloische Phase abgelöst [51].

Neuere Arbeiten zeigen einen Ursprung der die Leber besiedelnden hämatopoetischen Zellen aus dem Bereich der Splanchnopleura um die dorsale Aorta herum [82], [83], [4], [56]. Die genauen Beziehungen hepatischer und hämatopoetischer Zelllinien konnten allerdings nicht geklärt werden. Da ein großer Teil des fetalen Abdomens durch die Leber eingenommen wird, besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine rein platzbedingte Absiedelung der hämatopoetischen Zellen in der Leber ohne weitergehende Beziehungen zur Leber handelt. Die bereits erwähnte Ähnlichkeit im Markerprofil der Oval Cells und hämatopoetischer Zellen könnte allerdings ein Hinweis auf eine noch in der adulten Leber bestehende Verwandtschaft zwischen diesen Zelltypen sein [3], [43], [48], [46]. Es konnte gezeigt werden, dass fetale hämatopoetische Zellen der Ratte im Knochenmark der adulten Ratte Funktionen der Blutbildung überneh-

men können [11]. Neueste Arbeiten weisen darüber hinaus auch auf eine länger bestehende Verwandtschaft zwischen Leberzellen und im Knochenmark gelegenen Zellen hin [60], [61]. In Kokulturen mesenchymaler Stammzellen mit adulten und fetalen Hepatozyten konnten Hinweise auf ein Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen hin zu Hepatozyten gefunden werden [54], [53], [27].

## **1.2 Dieser Arbeit vorangehende Arbeiten**

In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in der fetalen Rattenleber zumindest zwei Typen von Leberzellen existieren: solche, die Thy1 exprimieren und solche, die eine Expression dieses Markers nicht zeigen [28]. Aus dieser Entdeckung ergab sich die Frage nach Unterschieden im Differenzierungs- und Wachstumspotenzial dieser Zellen.

## **1.3 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit**

Es schien lohnend und war das Ziel dieser Arbeit, weitere Erkenntnisse über die Eigenschaften beider fetaler Zelltypen zu bekommen. In Weiterführung der von Fiegel et al. durchgeführten Experimente [28] sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Ist MACS eine geeignete Methode, um Thy1 positive und negative Zellen zu sortieren?
- Unterscheiden sich die Thy1 positiven und negativen Zellen *in vitro* hinsichtlich ihrer Markerexpression auf mRNA-Ebene?
- Wie unterscheiden sich die beiden fetalen Zelltypen *in vitro* auf Proteinebene?
- Gibt es Unterschiede in der Wachstumskinetik zwischen Thy1 positiven und negativen Zellen *in vitro*?
- Wie unterscheidet sich die Wachstumskinetik der fetalen Hepatozyten von der adulter *in vitro*?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Ablauf der Experimente

Zur Klärung der in 1.3 formulierten Fragen wurden Experimente in folgender Weise durchgeführt: Es wurden fetale Hepatozyten der Embryonalstage 16, 18, 20 und 22 sowie adulte Hepatozyten isoliert. Eine Aufreinigung der Zellen erfolgte zunächst mittels Gradientenzentrifugation und Anreicherung hepatischer Zellen durch eine MACS-Depletion hämatopoetischer Zellen. Die fetalen Hepatozyten wurden dann mittels MACS in Thy1 positive und Thy1 negative Zellen sortiert. Die so gewonnenen Zellen wurden dann auf Kollagen I beschichteten 24-well Platten kultiviert und an den Kulturtagen 1, 3, 7 und 14 mittels RT-PCR und immunhistochemisch auf die Expression leberspezifischer Marker untersucht. Durch eine standardisierte Zellzählung mittels Rasterokular wurde eine Wachstumskinetik der verschiedenen Zelltypen ermittelt.

Das untenstehende Schema gibt den Ablauf der Experimente wieder.

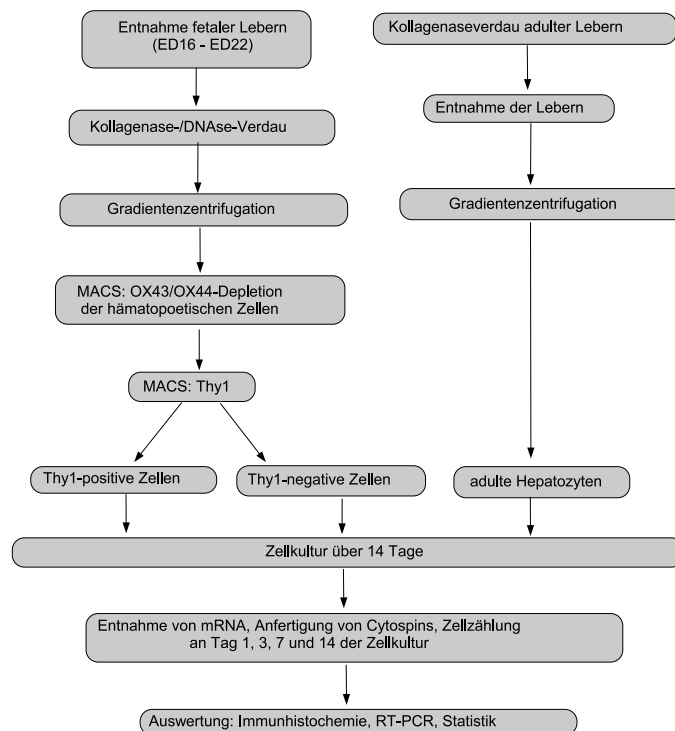


Abbildung 3: Ablauf der Experimente

## 2.2 Materialien und Bezugsquellen

### 2.2.1 Antikörper

#### **Antikörper zur Sortierung der Zellen mittels MACS**

mAb OX-43 (Serotec, Eching, Deutschland),

mAb OX-44 (Serotec, Eching, Deutschland),

mAb OX-7 (mouse-anti-rat Thy1, Pharmingen, Hamburg, Deutschland),

Goat-anti-mouse IgG gebundene magnetische Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany).

#### **Antikörper für die immunhistochemische Auswertung**

mAb OX-7 (Mouse-anti-rat, Thy1, Pharmingen, Hamburg, Deutschland),

mAb CK-18 (Mouse-anti-rat, ICN Cappel, Aurora, USA),

mAb AFP (Rabbit-anti-rat, Dako, Hamburg, Deutschland),

anti-Ratten-Albumin Antikörper, FITC markiert (DPC, Wiesbaden, Deutschland).

### 2.2.2 Sequenzen der verwendeten Primer

#### **GAPDH**

Sense: 5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT AC-3'

Antisense: 5'-GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC-3'

#### **Thy1**

Sense: 5'-CGC TTT ATC AAG GTC CTT ACT C-3'

Antisense: 5'-GCG TTT TGA GAT ATT TGA AGG T-3'

#### **CK18**

Sense: 5'-GGA CCT CAG CAA GAT CAT GGC-3'

Antisense: 5'-CCA CGA TCT TAC GGG TAG TTG-3'

#### **CK19**

Sense: 5'-ACC ATG CAG AAC CTG AAC GAT-3'

Antisense: 5'-CAC CTC CAG CTC GCC ATT AG-3'

**AFP I**

Sense I: 5'-AAC AGC AGA GTG CTG CAA AC-3'

Antisense I: 5'-AGG TTT CGT CCC TCA GAA AG-3'

**AFP II (nested)**

Sense II: 5'-CAC CAT CGA GCT CGC CTA TT-3'

Antisense II: 5'-TGA TGC AGA GCC TCC TGT TG-3'

**Albumin**

Sense: 5'-ATA CAC CCA GAA AGC ACC TC-3'

Antisense: 5'-CAC GAA TTG TGC GAA TGT CAC-3'

**2.2.3 Chemikalien**

Produkt	Hersteller
Aqua dest.	Baxter
NaCl	Merck
KCl	Merck
Hepes (ungelöst)	Gibco
Hepes (gelöst)	Gibco
NaOH	Merck
Kollagenase H (für adulte Hepatozyten)	Roche
Trypsin-Inhibitor, Soy Bean	Gibco
HBSS (-CaCl <sub>2</sub> , -MgCl <sub>2</sub> )	Gibco
DNase I	Roche
Kollagenase Typ IV (für fetale Hepatozyten)	Sigma
EGTA	Sigma
Albumine bovine serum, Fatty acid free	Sigma
Williams E without Glutamine	Gibco
Glutamine	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	Gibco
Natriumpyruvat	Gibco
Insulin	Gibco
EGF	Sigma
Dexamethason	Sigma
Fetales Kälberserum	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	Gibco

Produkt	Hersteller
BSA (gelöst)	Sigma
PBS	Gibco
Trypan-Blau	Gibco
Ethidiumbromid	Sigma
taq.Polymerase Kit	Invitrogen
Loading Dye Solution	Fermentas
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas
Agarose	Gibco
TAE	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Hämatoxilin	Sigma
Diaminobenzidin	Dako
Kollagen I Lösung	Sigma
Heparin Liquemin	Roche
Ethanol 70%	Mallinckrodt Baker B.V.
Diethylether	Riedel de Haen
Percoll (Dichte 1,124 g/ml)	Biochrom AG
Percoll (Dichte (1,130 g/ml)	Fluka BioChemica
Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek
First strand cDNA synthesis kit	Amersham Biosciences
Desinfektionsspray Cutasept	Bode Chemie, Hamburg

**2.2.4 Filtermaterial und Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Hersteller
24-well Platten	Nunc
Silikonschläuche	div. Hersteller
Absaugschläuche (Luftfallen)	div. Hersteller
Vierwegehähne	div. Hersteller
Venenverweilkanüle Vasofix Braunüle	B.Braun Melsungen AG
Nahtmaterial, u.a. Vicryl	div. Hersteller, Ethicon
Insulinspritzen	div. Hersteller
Textilklebeband	div. Hersteller
Injektionskanülen	div. Hersteller
Nylongewebe, Maschengrösse 200 $\mu$ m	div. Hersteller
Tubes	Sarstedt
MACS Separation Columns AS und MS	Miltenyi Biotec GmbH
Spritzenvorsatzfilter 0,45 $\mu$ m	Schleicher und Schuell
Einwegspritzen	div. Hersteller
Pipettenspitzen für Akkupipette 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	BD Biosciences
Filter 0,2 $\mu$ m für Lösungen "Steritop"	Millipore Corp.
Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten	Sarstedt



**2.2.5 Technische Geräte und Glaswaren**

Produkt	Hersteller
Akkupipette pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten 100-1000 $\mu$ l, 20-200 $\mu$ l, 0,1-10 $\mu$ l	Eppendorf Research
Trichter	div. Hersteller
Zentrifuge "Biofuge Stratos"	Heraeus Instruments
Kulturschrank "Function Line"	Heraeus Instruments
Gelkammer	Bio-Rad
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Cytozentrifuge "Cytospin 3"	Shandon
Glasglocke	div. Hersteller
Korkplatten	div. Hersteller
div. OP-Instrumente	div. Hersteller
Thermocycler "T personal"	Biometra
Mikroskop für Photos der Immunhistochemie "BX-60"	Olympus
Beheiztes Wasserbad	Memmert
Kugelpumpe	div. Hersteller
Zählkammer "Neubauer improved"	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Mikroskop für Zellzählungen "CH-2"	Olympus
Thermoblock	Eppendorf Research
Thermomixer "comfort"	Eppendorf Research
Dissektionsmikroskop "S240"	Olympus
Autoklav "HRM-242 II"	Heraeus Instruments
Invertoskop "IX50"	Olympus
Rasterokular "WH10X-H/22"	Olympus
Div. Glasbehältnisse	Schott
Transilluminator "TI1"	Biometra

## 2.3 Allgemeine Arbeitsmethoden

### 2.3.1 Sterilisierung der Arbeitsmaterialien

Gegenstände aus Polypropylen (Eppendorftubes, Pipettenspitzen), Glasgeräte und Operationsbesteck wurden im Autoklaven in feuchter Hitze bei 2 bar und 120°C für 20min autoklaviert. Flüssigkeiten wurden, soweit nötig, durch Filtration mit 0,2 $\mu$ m Filtern sterilisiert.

### 2.3.2 EDV

Die Erfassung und statistische Auswertung der durch Zellzählung gewonnenen Daten erfolgte auf einem PC mit dem Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional unter Verwendung von Microsoft Excel XP. Photos der Elektrophoresegele wurden mittels eines Transilluminators und einer an einen Windows-basierten PC angeschlossenen Kamera angefertigt, Photos der Cytospin-Präparate wurden ebenfalls mit einer an einen Windows-basierten PC angeschlossenen Kamera angefertigt.

Der Satz dieser Arbeit erfolgte mit  $\text{\TeX}$ .

### 2.3.3 Zellzählung mittels Trypan-Blau-Methode

Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Isolation und vor der Aussiedelung der fetalen und adulten Hepatozyten war eine möglichst genaue Abschätzung der vorhandenen Zellzahl nötig.

Zur Zählung und Bestimmung der Viabilität der frisch isolierten adulten und fetalen Hepatozyten wurden je 100 $\mu$ l (adulte Zellen) bzw. 10 $\mu$ l (fetale Zellen) der Zellsuspensionen 1:10 (adulte Zellen) bzw. 1:100 (fetale Zellen) mit einer 0,09%igen Trypan-Blau-Lösung, bestehend aus 900 $\mu$ l Williams E without Glutamine und 100 $\mu$ l 0,9%iger Trypan-Blau-Lösung verdünnt. Die absoluten Zellzahlen und der Anteil der lebendigen Zellen wurden mittels einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

## 2.4 Lösungen für die Zellisolationen

Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

### 2.4.1 Lösungen für die Isolation adulter Hepatozyten

#### **Pufferlösung**

In 1000ml Aqua dest. wurden 8,3g NaCl, 0,5g KCl und 2,38g HEPES-Puffer gelöst. Der pH wurde mit einmolarer NaOH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit einem 0,2 $\mu$ m-Filter steril filtriert.

#### **Kollagenaselösung**

In 1000ml Aqua dest. wurden 8,3g NaCl, 0,5g KCl, 0,7g CaCl<sub>2</sub>, 2,38g HEPES-Puffer, 500mg Kollagenase und 7,5 $\mu$ g Trypsin-Inhibitor gelöst. Der pH wurde mit einmolarer NaOH auf 7,35 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit einem 0,2 $\mu$ m-Filter steril filtriert.

### 2.4.2 Lösungen für die Isolation fetaler Hepatozyten

#### **HBSS (modifiziert):**

1l HBSS wurden 20ml 1M HEPES zugegeben.

#### **HBSS-A:**

100ml HBSS (modifiziert) wurden 14,7mg CaCl<sub>2</sub> und 0,06g DNaseI zugegeben.

#### **HBSS-A/Kollagenase:**

0,09g Kollagenase wurden in 17ml HBSS-A gelöst und mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,45 $\mu$ m) steril filtriert.

#### **HBSS-B:**

100ml HBSS (modifiziert) wurden 10ml 50mM EGTA zugegeben.

#### **HBSS-C:**

200ml HBSS (modifiziert) wurden 800 $\mu$ l 50mM EGTA und 1g BSA zugegeben.

### 2.4.3 Dichte des Percoll-Gradienten bei den fetalen Hepatozyten

Je nach Embryonaltag wurde bei der Gradientenzentrifugation der fetalen Hepatozyten ein Percoll-Gradient unterschiedlicher Dichte verwendet. Die Einstellung erfolgte durch Verdünnung aus einer Percoll-Lösung der Dichte 1,124g/ml mit PBS entsprechend der Tabelle.

ED	Zieldichte [g/ml]	Percoll [ml]	PBS[ml]
16	1,095	15,1	4,9
18	1,086	13,6	6,4
20	1,077	12,1	7,9
22	1,068	19,6	9,4

## 2.5 Isolationsprozeduren

### 2.5.1 Isolationsprozedur für adulte Hepatozyten

Vor Beginn der Operation wurden Puffer- und Kollagenaselösung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Perfusionsapparatur wurde gründlich mit Aqua dest. gespült, um Reste des 70%igen Alkohols zu entfernen, mit dem die Apparatur befüllt wurde, wenn sie nicht benötigt wurde. Die Pumpe wurde so eingestellt, dass die Perfusionsgeschwindigkeit sowohl für die Puffer- als auch für die Kollagenaselösung 30ml/min betrug.

Als nächstes wurde die adulte Ratte unter einer Glocke mit Äther narkotisiert. Das narkotisierte Tier wurde dann auf einer Korkplatte fixiert und gründlich mit alkoholischer Desinfektionslösung (Cutasept) abgesprüht, anschließend wurde unter Aufrechterhaltung der Äthernarkose der Bauchraum mit einem V-förmigen Schnitt eröffnet. Mit einer Klemme wurde die Bauchdecke fixiert, der Darm wurde mittels eines befeuchteten Watteträgers nach links herausgeklappt, um einen besseren Zugang zum Gefäßsystem der Leber zu erhalten. Nach Darstellung von Leberhilus, Vena portae, Vena pylorica, Vena lienalis und Vena cava inferior wurden Vena pylorica und Vena lienalis ligiert. Durch Injektion von 500IE Heparin (0,1ml Heparin und 0,2ml Aqua dest) in die Vena



Abbildung 4: Das Tier ist auf einer Korkplatte fixiert. Man erkennt die in der Vena portae liegende Braunüle.

cava inferior wurde das Tier heparinisiert, um die Blutgerinnung zu unterbinden.

Anschließend wurde die Vena portae distal der Vena lienalis ligiert und eingeschnitten. Unter Spülen mit Pufferlösung wurde dann die Braunüle in die Vena portae vorgeschoben und mittels einer Klemme im Gefäß zwischen Vena pylorica und Vena lienalis fixiert. Um den Abfluss der perfundierten Lösungen zu gewährleisten, wurde die Vena cava inferior eingeschnitten. Die Perfusion mit Pufferlösung erfolgte über einen Zeitraum von sechs Minuten. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Kollagenaselösung, bis die Leber deutlich angeschwollen war und sich die Kanten der Leber gerundet hatten. Die Perfusionszeit betrug zwischen acht und zwölf Minuten.

Während der gesamten Perfusion wurde die Leber von außen mit Hilfe eines Watteträgers feucht gehalten. Nach Beendigung der Perfusion wurde die Leber entnommen und in ein 50ml-Falcon-Tube mit Williams E Medium without Glutamine überführt. Die weitere Arbeit erfolgte unter der sterilen Werkbank.

Die Leber wurde auf eine sterile Petrischale auf Eis überführt, die Leberkapsel abpräpariert und die Leberzellen durch leichtes Schütteln in Williams E Medium without Glutamine suspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch einen mit Nylogewebe mit 200 $\mu$ m Maschen bespannten Trichter in ein 50ml-Falcon-Tube überführt. Von der Zellsuspension wurde mit Hilfe der Trypan-Blau-Methode die Zellzahl und der Anteil der überlebenden Zellen bestimmt.

Dann erfolgte eine erste Zentrifugation (3', 50g, 4°C, Beschleunigung und Bremse auf 4 eingestellt). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 15ml Williams E without Glutamine resuspendiert und erneut zentrifugiert (3', 50g, 4°C, Beschleunigung und Bremse auf 4 eingestellt). Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Pellet in 15ml Williams E without Glutamine resuspendiert und auf 23ml aufgefüllt. 2,4ml zehnfach konzentriertes PBS und 14,5ml Percoll (Dichte 1,130g/ml) wurden zugegeben. Anschließend wurde bei 12' bei 1500rpm (entspricht ca. 312g) und 4°C zentrifugiert. Bremse und Beschleunigung der Zentrifuge wurden auf 5 gestellt.

Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet wurde in 25ml Williams E without Glutamine resuspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (3', 50g, 4°C, Beschleunigung und Bremse auf 4 eingestellt) wurde das Pellet in 10ml Kulturmedium suspendiert und eine Zellzählung mit der Trypan-Blau-Methode durchgeführt. Die benötigte Zellzahl wurde entnommen, in Kulturmedium suspendiert und für die Zellkultur verwendet.

### 2.5.2 Isolationsprozedur für fetale Hepatozyten

Die tragenden Ratten wurden am 16., 18., 20. und 22. Tag der Schwangerschaft mit einer Überdosis Äther getötet. Der Uterus wurde entnommen und unter einem Binokular die Lebern der einzelnen Feten entnommen. Je zwei Lebern wurden in eines von insgesamt vier Rollrandgläschen überführt, die je 1-2ml HBSS-Puffer enthielten und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Nach Entnahme aller benötigten Lebern wurden die Lebern mit einer Schere in den Rollrandgläsern zerteilt. Der Kollagenase-/DNase-Verdau erfolgte durch dreimaligen fünf Minuten dauernden Verdau der Lebern mit 5ml HBSS-A/ Kollagenase unter Schütteln in einem Wasserbad bei 37°C. Der Überstand aus jedem Rollrandgläschen wurde in je einem 50ml Falcon-Tube gesammelt. Nach Beendigung des Verdau wurden 10ml HBSS-B zugegeben und der Inhalt jedes Falcon-Tubes unter Filtration mit einem 40 $\mu$ m Zellfilter in je ein neues 50ml Falcon Tube überführt.

Die erste Zentrifugation der Zellen erfolgte für 5' bei 450g und 4°C, Beschleunigungseinstellung 4, Bremseinstellung 1. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 8ml HBSS-C resuspendiert. In vier weiteren 50ml Falcon-Tubes wurde der Percoll-Gradient für die weitere Aufreinigung der Zellen vorbereitet (Dichte entsprechend der Tabelle unter 2.4.3). Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf die Percoll-Lösung gegeben, es erfolgte eine anschließende Zentrifugation für 20' bei 450g und 17°C, Beschleunigungseinstellung 2, Bremseinstellung 1. Die Hepatozyten wurden vorsichtig abpipettiert, in 15ml HBSS-C suspendiert und für 10' bei 350g und 14°C, Beschleunigungseinstellung 4, Bremseinstellung 1 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Hepatozyten in 1ml HBSS-C resuspendiert. Eine Kontrolle der Zellzahl und Überlebensrate der isolierten Zellen erfolgte mit der Trypan-Blau-Methode. Die Zellsuspensionen wurden auf Eis mit je 15 $\mu$ l OX43 und 2,6 $\mu$ l OX44-Antikörper 30min inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in je 10ml HBSS-C resuspendiert und für 5' bei 450g und 4°C, Beschleunigungseinstellung 4, Bremseinstellung 1 zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände und Resuspendieren in je 100 $\mu$ l HBSS-C erfolgte die fünfzehnminütige Inkubation mit 20 $\mu$ l Microbeads auf Eis. Die Zellsuspensionen wurden mit je 400 $\mu$ l HBSS-C

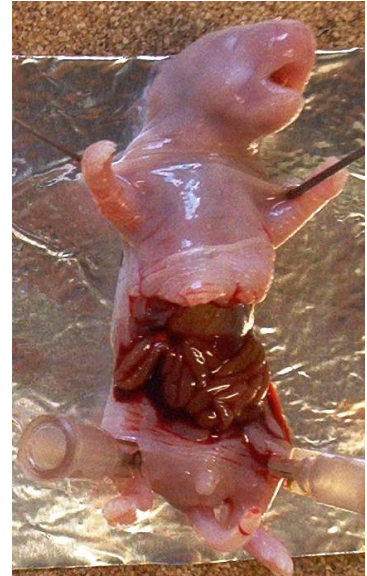


Abbildung 5: Präparation einer fetalen Leber.

resuspendiert und auf die zuvor mit HBSS-C gespülte MACS-Säule gegeben. Die Zellsuspensionen aus insgesamt vier Lebern wurden in je einem 50ml Falcon-Tube gesammelt, die Säule wurde mit 5ml HBSS-C nachgespült. Beide so erhaltene Zellsuspensionen wurden auf 10ml mit HBSS-C aufgefüllt und anschließend für 5' bei 450g und 4°C, Beschleunigungseinstellung 4, Bremseinstellung 1, zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellen erneut in je 1ml HBSS-C resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann 30min auf Eis mit je 30 $\mu$ l Thy1-Antikörper inkubiert. Nach Zugabe von je 2ml HBSS-C erfolgte eine Zentrifugation für 5' bei 4°C und 450g, Beschleunigungseinstellung 4, Bremseinstellung 1. Nach Absaugen der Überstände wurden die Zellen in je 70 $\mu$ l HBSS-C resuspendiert. Jede Zellsuspension wurde dann 15min auf Eis mit je 30 $\mu$ l Microbeads inkubiert. Zu jeder Zellsuspension wurde dann je 1ml HBSS-C zugegeben. Die Suspensionen wurden dann auf eine MicroMACS-Säule gegeben, die zuvor mit 1ml HBSS-C gespült worden war. Die Fraktion der Thy1 negativen Zellen wurde in einem 50ml Falcon-Tube gesammelt, es wurde mit 1ml HBSS-C nachgespült. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Fraktion der Thy1 positiven Zellen durch Spülen mit 2ml HBSS-C in einem weiteren 50ml Falcon-Tube gewonnen.

Beide Zellfraktionen wurden mit der Trypan-Blau-Methode untersucht und die benötigte Menge Zellen für die Zellkultur entnommen.

## 2.6 Zellkultur

### 2.6.1 Kollagenbeschichtung der Kulturplatten

Für die Zellkultur wurden 24 Well-Platten unter sterilen Bedingungen mit Kollagen I beschichtet. Zu diesem Zweck wurde jedes Well mit 0,2 ml einer 0,1%igen Kollagen I Lösung befüllt. Die Kulturplatten wurden mindestens einen Tag bei 7°C gelagert.

Vor Verwendung der Kulturplatten wurde die Kollagenlösung abgesaugt und jedes Well einmal mit PBS gespült.

### 2.6.2 Kulturmedien

#### Kulturmedium für adulte Hepatozyten

Das Medium bestand aus 500ml Williams E without Glutamine, 5,5ml Glutamin, 5,5ml Penicillin/ Streptomycin, 11ml HEPES, 11ml Natriumpyruvat, 10IU Insulin, 5 $\mu$ g EGF und 6,25nM Dexamethason. Für die Primärkultur wurden dem Medium zusätzlich 10% FCS zugegeben.

Beide Medien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und bis zur Verwendung bei 7°C gelagert.

### **Kulturmedium für fetale Hepatozyten**

Das Medium bestand aus 500ml Williams E without Glutamine, 5,5ml Glutamin, 5,5ml Penicillin/ Streptomycin, 10ml Hepes, 10ml Natriumpyruvat, 10IU Insulin, 100mg Magnesiumsulfat, 5µg EGF, 6,25nM Dexamethason, 0,5g BSA (0,1%) und 50ml FCS.

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt und bis zur Verwendung bei 7°C gelagert.

### **2.6.3 Kulturbedingungen**

Die Zellkultur erfolgte auf Kollagen-I- beschichteten 24 well Platten. Je well wurden 125000 Zellen ausgesiedelt. Der erste Medienwechsel erfolgte nach 24h. Bei der Kultur der adulten Hepatozyten wurde bis zum ersten Medienwechsel das Primärkulturmedium verwendet, ab dem ersten Medienwechsel das Kulturmedium für adulte Hepatozyten. Bei der Kultur der fetalen Hepatozyten wurde während der gesamten Zellkultur das Kulturmedium für fetale Hepatozyten verwendet.

Die Zellkultur erfolgte über 14 Tage bei 37°C, 70%relativer Feuchte und 5%CO<sub>2</sub>; ein Medienwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt.

## **2.7 Datengewinnung**

### **2.7.1 Standardisierte Zellzählung**

Für die Zählung der in Kultur befindlichen Zellen wurde eine Zählung unter dem Invertoskop unter Verwendung eines Rasterokulars durchgeführt. Es wurde je Well insgesamt 1mm<sup>2</sup> an vier zufällig gewählten Stellen ausgezählt. Für jede Kultur wurden für jeden untersuchten Kulturzeitpunkt drei unterschiedliche Wells ausgezählt.



## 2.7.2 Untersuchung der Markerexpression auf RNA-Ebene

### 2.7.2.1 Isolation von mRNA

Die Isolation der mRNA erfolgte mit dem Invisorb SpinCell RNA MiniKit gemäß dem dem Kit beiliegenden Protokoll.

Hierzu wurde zunächst aus je drei Wells das Medium abgesaugt und anschließend einmal mit PBS gespült. In jedes Well wurden dann 350 $\mu$ l Lysis Solution R gegeben. Das Zelllysat wurde dann mit einer Pipette aufgenommen und auf einen in einem Receiver Tube befindlichen DNA-Binding Spin Filter überführt. Nach einminütiger Inkubation wurde mit der Tischzentrifuge bei 11000 U/min 2min zentrifugiert. Der DNA-Filter wurde verworfen und dem Lysat die gleiche Menge 70%iges Ethanol zugegeben. Das Lysat wurde dann auf einen RNA-Binding Spin Filter gegeben, der sich in einem frischen Receiver Tube befand. Nach einminütiger Inkubation wurde mit der Tischzentrifuge bei 11000 U/min 30sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend 600 $\mu$ l Washing Buffer R1 auf den RNA-Filter gegeben. Es erfolgte dann eine Zentrifugation bei 11000 U/min mit der Tischzentrifuge für 30sec; der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend erfolgte eine zweimalige Waschung des Filters in gleicher Weise mit je 500 $\mu$ l Washing Buffer R2. Der RNA-Filter wurde anschließend für 3min bei 11000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der RNA-Filter in ein Elution-Tube überführt und 75 $\mu$ l Elution Buffer R auf den Filter gegeben. Nach zweiminütiger Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 U/min für 1min. Der RNA-Filter wurde verworfen, das RNA-haltige Eluat sofort mit flüssigem N<sub>2</sub> tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für spätere Positivkontrollen bei der Polymerasekettenreaktion wurden in gleicher Weise mRNA Proben aus frisch isolierten adulten Leberzellen angefertigt.

### 2.7.2.2 Umschreiben der mRNA in cDNA

Das Umschreiben der mRNA erfolgte unter Verwendung des First strand c-dna synthesis kit. Hierzu wurden 20 $\mu$ l jeder RNA-Probe entnommen und bei 65°C 10min im Thermoblock inkubiert. Jeder RNA-Probe wurden dann 11 $\mu$ l Bulk Mix, 1 $\mu$ l dTT und 1 $\mu$ l PdN6 zugegeben. Die Ansätze wurden gevortext, zentrifugiert und für 60min bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Der so erhaltenen cDNA wurden je 17 $\mu$ l RNase freies H<sub>2</sub>O zugegeben. Die cDNA-Proben wurden anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.7.2.3 PCR

Die Durchführung der Polymerasekettenreaktion erfolgte unter Verwendung des Taq. Polymerase Kits. Es wurden je  $7\mu\text{l}$  aus mRNA umgeschriebener cDNA verwendet. Je Probe wurden  $5\mu\text{l}$  10x Puffer,  $1\mu\text{l}$  DNTPs,  $1\mu\text{l}$  Sense-Primer,  $1\mu\text{l}$  Antisense Primer (Sequenzen der Primer siehe unter 2.2.2),  $0,5\mu\text{l}$  Taq. Polymerase und  $34\mu\text{l}$  DdH<sub>2</sub>O zugegeben. Nach Vortexen und Herunterzentrifugieren der Ansätze wurden diese in den Thermocycler gegeben und dieser entsprechend den verwendeten Primern eingestellt (Annealingbedingungen und Programmablauf siehe Tabelle unter 2.7.2.4). Im Fall der PCR für Alphafetoprotein wurde eine nested-PCR durchgeführt; hierbei wurden  $7\mu\text{l}$  des mit den Primern AFP I Sense I und Antisense I erhaltenen Amplifikats mit den Primern AFP II Sense II und Antisense II erneut amplifiziert. Bei jeder PCR wurden für jeden untersuchten Marker Negativkontrollen aus H<sub>2</sub>O und Positivkontrollen aus Leberstandard, bei einigen zusätzliche Positivkontrollen aus Nierenstandard mitgeführt. Bis zur Verwendung der Amplifikate wurden diese bei 4°C gelagert.

### 2.7.2.4 Programme Thermocycler

Die Tabelle zeigt die bei der PCR verwendeten Annealingbedingungen und den Programmverlauf für die untersuchten cDNAs.

Arbeitsschritt:							
1.	10min Denaturieren bei 94°C						
2.	Beginn des PCR-Zyklus, Anzahl der Wiederholungen:						
	GAPDH	Albumin	AFP I	AFP II	CK 18	CK 19	Thy 1
	30	25	35	30	30	30	29
2.1	1min Denaturieren bei 94°C (Alle)						
2.2	1min Annealing bei [°C]:						
	GAPDH	Albumin	AFP I	AFP II	CK 18	CK 19	Thy 1
	60	60	55	60	60	60	52
2.3	1min Verlängerung bei 72°C (Alle)						
Ende des PCR-Zyklus.							
3.1	4 min bei 72°C						
3.2	Aufbewahren bis zur Entnahme aus dem Thermozykler bei 4°C.						

### 2.7.2.5 Gel-Elektrophorese

Es wurden Agarosegele mit 20 Slots verwendet, die aus 50ml 0,5%igem TAE-Puffer, 0,75g Agarose und 3 $\mu$ l Ethidiumbromid gegossen wurden. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer bedeckt. In jeden Slot wurden 10 $\mu$ l eines Ansatzes aus dem PCR-Amplifikat mit 10 $\mu$ l 6x Loading Dye gegeben, die zuvor gevortext wurden. In einen freien Slot des Gels wurden außerdem 10 $\mu$ l 100bp DNA-ladder gegeben. Das Gel lief dann 45min bei 120V.

Photos des Gels wurden mittels UV-Transilluminator mit einer an einen MS-Window basierten PC angeschlossenen Kamera angefertigt. Von diesen Photos wurden zur Dokumentation sowohl Videoprints als auch Dateien gesammelt.

## 2.7.3 Untersuchung der Markerexpression auf Proteinebene

### 2.7.3.1 Anfertigung von Cytospins

Von allen Zellkulturen wurden zu den untersuchten Kulturzeitpunkten Cytospins angefertigt. Zu diesem Zweck wurde aus je drei Wells das Kulturmedium abgesaugt, die Wells einmal mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin-EDTA überschichtet. Unter dem Invertoskop wurde der Ablösevorgang der Zellen kontrolliert. Nach möglichst vollständigem Ablösen der Hepatozyten wurde die Zellsuspension in einem 50ml Falcon-Tube gesammelt und diese zentrifugiert (3', 50g, 4°C, Beschleunigung und Bremse auf 4 eingestellt). Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert, nach Ermittlung der Zellkonzentration mit der Trypan-Blau-Methode wurden 20 \* 10<sup>6</sup> Zellen entnommen und zur Anfertigung von 10 Cytospins verwendet (Einstellung der Cytozentrifuge: 5', medium acceleration, 450rpm).

Die Cytospins wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag in Methanol bei -20°C für 5min und anschließend in Aceton bei 4°C für 10s fixiert. Bis zur Färbung wurden die Cytospins dunkel und trocken verwahrt.

### 2.7.3.2 Immunhistochemie

Die immunzytochemische Analyse erfolgte unter Verwendung monoklonaler Maus-Antikörper, die spezifisch für Thy1 und CK-18 waren, monoklonaler Kaninchenantikörper, die spezifisch für AFP waren und polyklonaler FITC markierter anti-Ratten-Albumin Antikörpern.

Die Färbung für Thy1 und CK18 erfolgte unter Verwendung der Alkalischen Phosphatase-Antialkalischen Phosphatase (APAAP) Technik. Hierzu wurden die Thy1 Antikörper 1:50, die CK18 Antikörper 1:10 verdünnt. Die Sekundärmarkierung erfolgte mit 1:50 verdünntem monoklonalen Kaninchen-anti-Maus IgG Antikörper. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Objektträger mit dem Maus-APAAP-Komplex. Zur Färbung wurde Neofuchsin als Substrat der alkalischen Phosphatase verwendet.

Bei den für die AFP-Färbung gedachten Objektträgern wurde zunächst die endogene Peroxidase mit 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  geblockt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem 1:500 verdünnten primären Antikörper. Zur sekundären Markierung wurde ein 1:50 verdünnter HRP-konjugierter Schwein-anti-Kaninchen IgG Antikörper verwendet.

Für die Albuminfärbung wurde ebenfalls zunächst die endogene Peroxidase mit 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  geblockt. Anschließend wurden die Objektträger mit dem 1:500 verdünnten primären Antikörper inkubiert und danach mit dem 1:100 verdünnten HRP-konjugierten Kaninchen-anti-FITC Antikörper sekundär markiert. Die Färbereaktion erfolgte mit Diaminobenzidin. Die Gegenfärbung der Objektträger erfolgte mit Hämatoxilin.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wachstumskinetik

#### 3.1.1 Gesammelte Daten aus den Zellkulturen

Die Tabellen auf den folgenden Seiten enthalten die mittels Rasterokular in drei Wells standardisiert ausgezählten absoluten Hepatozytenzahlen pro  $\text{mm}^2$ , deren Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die auf Kulturtag 1 bezogenen relativen Zellzahl-Mittelwerte und deren Standardabweichungen für die angelegten Zellkulturen und untersuchten Kulturtage.

Für die fetalen Hepatozyten sind in der Tabelle unter 3.1.2 die Ergebnisse des zweiseitigen T-Tests für die relativen Zellzahlen der Thy1 positiven und Thy1 negativen fetalen Hepatozyten eines bestimmten Embryonaltages zu einem bestimmten Kulturtag enthalten.

In den Diagrammen sind jeweils die relativen Mittelwerte im Verlauf der gesamten Kulturperiode dargestellt.

## 3.1.1.1 Wachstumskinetik der adulten Hepatozyten

<b>Adulte Zellkultur</b>	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Zellen mm<sup>2</sup></b>	129	160	191	163
<b>Zellen mm<sup>2</sup></b>	132	154	139	125
<b>Zellen mm<sup>2</sup></b>	133	157	127	133
Mittelwert	131,33	157	152,33	140,33
Std.abw.(abs)	2,08	3	34,02	20,03
Mittelwert(rel)	100	119,54	115,99	106,85
Std.abw.(rel)	1,59	1,91	22,33	14,28

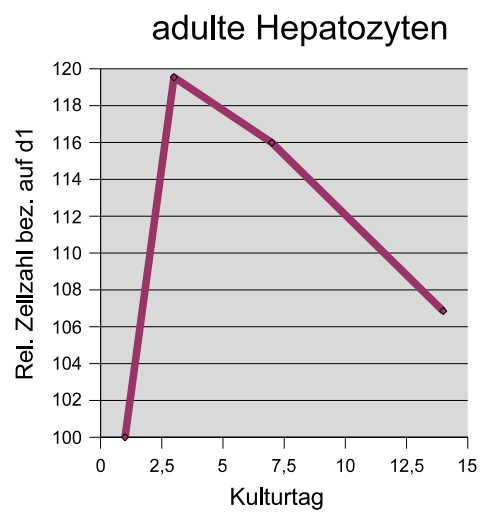


Abbildung 6: Wachstumskinetik der adulten Hepatozyten

## 3.1.1.2 Zellzahlen der Thy1 positiven fetalen Hepatozyten

ED16,CD90+	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	136	177	430	1930
Zellen/mm <sup>2</sup>	106	178	439	1340
Zellen/mm <sup>2</sup>	143	136	401	2300
Mittelwert(abs)	128,33	163,67	423,33	1856,67
Std.abw.(abs)	19,66	23,97	19,86	484,18
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	105,97	137,92	335,06	1503,9
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	82,6	138,7	342,08	1044,16
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	111,43	105,97	312,47	1792,21
Mittelwert (rel)	100	127,53	329,87	1446,75
Std.abw.(rel)	15,32	18,67	15,47	377,29

ED18,CD90+	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	371	176	253	603
Zellen/mm <sup>2</sup>	373	168	244	667
Zellen/mm <sup>2</sup>	354	177	269	598
Mittelwert(abs)	366	173,67	255,33	622,67
Std.abw.(abs)	10,44	4,93	12,66	38,48
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	101,37	48,09	69,13	164,75
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	101,91	45,9	66,67	182,24
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	96,72	48,36	73,5	163,39
Mittelwert (rel)	100	47,45	69,76	170,13
Std.abw.(rel)	2,85	1,35	3,46	10,51

ED20,CD90+	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	87	70	95	51
Zellen/mm <sup>2</sup>	102	93	107	63
Zellen/mm <sup>2</sup>	64	72	98	49
Mittelwert(abs)	84,33	78,33	100	54,33
Std.abw.(abs)	19,14	12,74	6,24	7,57
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	103,16	83	112,65	60,47
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	120,95	110,28	126,88	74,7
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	75,89	85,38	116,21	58,1
Mittelwert (rel)	100	92,89	118,58	64,43
Std.abw.(rel)	22,7	15,11	7,41	8,98

ED22,CD90+	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	56	40	879	559
Zellen/mm <sup>2</sup>	43	45	921	611
Zellen/mm <sup>2</sup>	47	39	892	545
Mittelwert(abs)	48,67	41,33	897,33	571,67
Std.abw.(abs)	6,66	3,21	21,5	34,78
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	115,07	82,19	1806,16	1148,63
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	88,36	92,47	1892,47	1255,48
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	96,58	80,14	1832,88	1119,86
Mittelwert (rel)	100	84,93	1843,84	1174,66
Std.abw.(rel)	13,68	6,61	44,18	71,46

## 3.1.1.3 Zellzahlen der Thy1 negativen fetalen Hepatozyten

ED16,CD90-	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	140	480	590	767
Zellen/mm <sup>2</sup>	120	375	603	712
Zellen/mm <sup>2</sup>	151	490	576	790
Mittelwert(abs)	137	448,33	589,67	756,33
Std.abw.(abs)	15,72	63,71	13,5	40,08
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	102,19	350,36	430,66	559,85
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	87,59	273,72	440,15	519,71
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	110,22	357,66	420,44	576,64
Mittelwert (rel)	100	327,25	430,41	552,07
Std.abw.(rel)	11,47	46,5	9,86	29,25

ED18,CD90-	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	580	262	464	495
Zellen/mm <sup>2</sup>	591	311	415	501
Zellen/mm <sup>2</sup>	520	235	403	513
Mittelwert(abs)	563,67	269,33	427,33	503
Std.abw.(abs)	38,21	38,53	32,32	9,17
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	102,9	46,48	82,32	87,82
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	104,85	55,17	73,63	88,88
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	92,25	41,69	71,5	91,01
Mittelwert (rel)	100	47,78	75,81	89,24
Std.abw.(rel)	6,78	6,84	5,73	1,63

ED20,CD90-	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	683	492	143	162
Zellen/mm <sup>2</sup>	715	315	211	157
Zellen/mm <sup>2</sup>	656	411	149	161
Mittelwert(abs)	684,67	406	167,67	160
Std.abw.(abs)	29,54	88,61	37,65	2,65
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	99,76	71,86	20,89	23,66
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	104,43	46,01	30,82	22,93
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	95,81	60,03	21,76	23,52
Mittelwert (rel)	100	59,3	24,49	23,37
Std.abw.(rel)	4,31	12,94	5,5	0,39

ED22,CD90-	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Zellen/mm <sup>2</sup>	280	376	1086	787
Zellen/mm <sup>2</sup>	293	403	839	711
Zellen/mm <sup>2</sup>	179	388	967	753
Mittelwert(abs)	250,67	389	964	750,33
Std.abw.(abs)	62,4	13,53	123,53	38,07
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	111,7	150	433,24	313,96
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	116,89	160,77	334,71	283,64
Zellen/mm <sup>2</sup> (rel)	71,41	154,79	385,77	300,4
Mittelwert (rel)	100	155,19	384,57	299,34
Std.abw.(rel)	24,9	5,4	49,28	15,19



## 3.1.2 Auswertung - Tabellarische Zusammenfassung

<b>Zweiseitiger T-Test CD90+/- Zellen:</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>ED16 CD90+/-</b>	1,00000	0,02821	0,00141	0,04696
<b>ED18 CD90+/-</b>	1,00000	0,95008	0,30368	0,00615
<b>ED20 CD90+/-</b>	1,00000	0,16871	0,00018	0,01684
<b>ED22 CD90+/-</b>	1,00000	0,00098	0,00135	0,00305

Es ergaben sich statistische Unterschiede mit  $p < 0,05$  für die Zellkulturen von ED16 an den Tagen 3 und 14 sowie ED20 an Tag 14 und  $p < 0,01$  für die Zellkulturen von ED16 an Tag 7, ED18 an Tag 14, ED20 an Tag 7 sowie ED22 an den Tagen 3, 7 und 14.

## 3.1.3 Diagramme - Wachstumskinetik der fetalen Hepatozyten

## ED16: Wachstumsverhalten CD90+/- Zellen

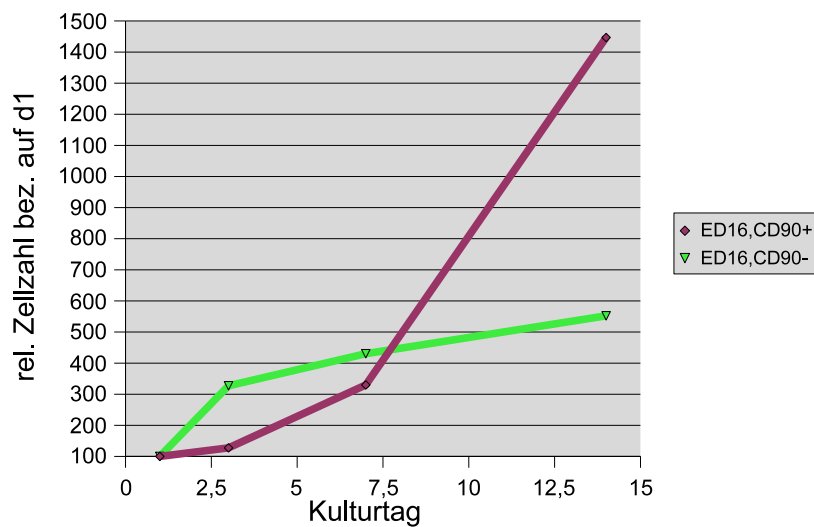


Abbildung 7: Wachstumskinetik der Zellen von ED16

## ED18: Wachstumsverhalten CD90+/- Zellen

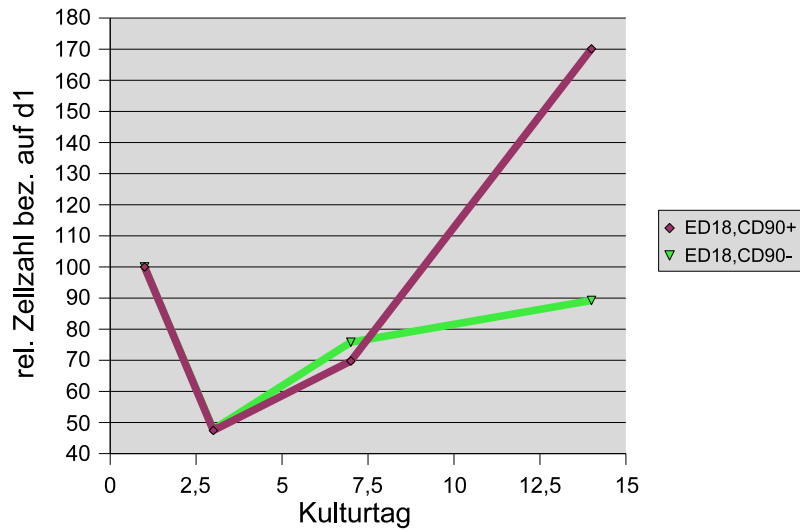


Abbildung 8: Wachstumskinetik der Zellen von ED18

## ED20: Wachstumsverhalten CD90+/- Zellen

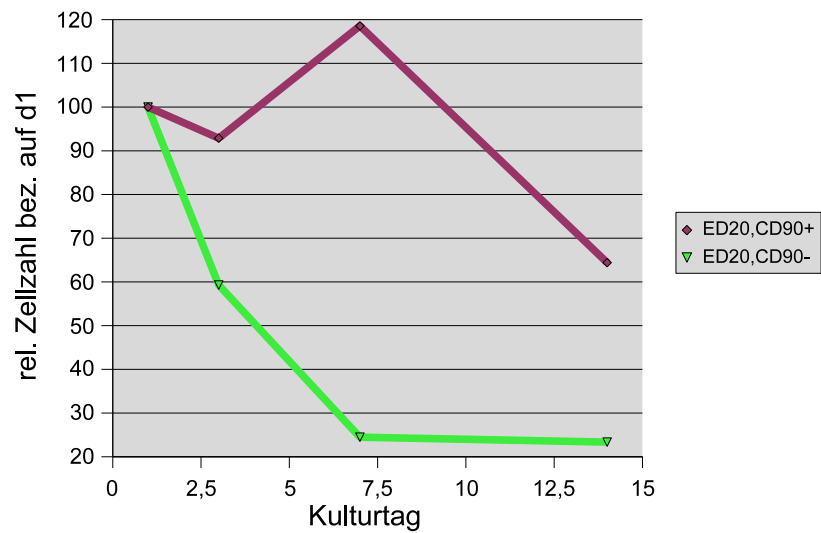


Abbildung 9: Wachstumskinetik der Zellen von ED20

## ED 22: Wachstumsverhalten CD90+/- Zellen

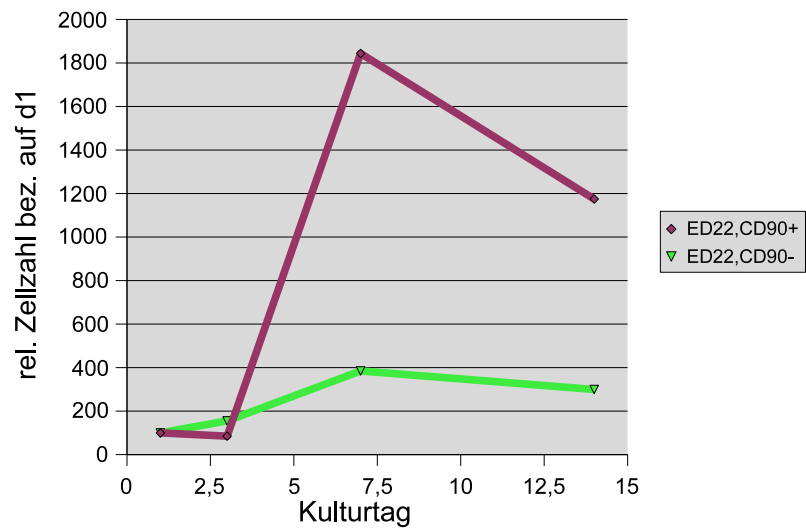


Abbildung 10: Wachstumskinetik der Zellen von ED22

## 3.2 Ergebnisse der PCR

### 3.2.1 adulte Hepatozyten

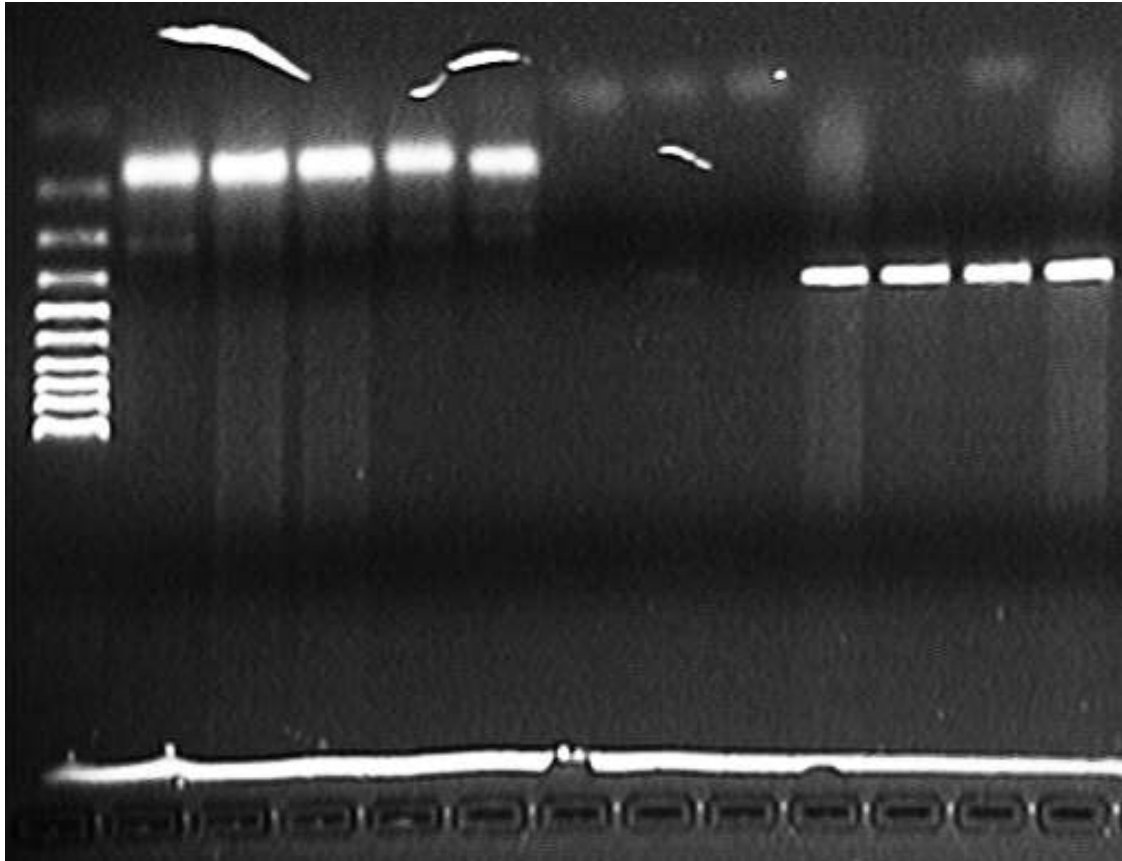
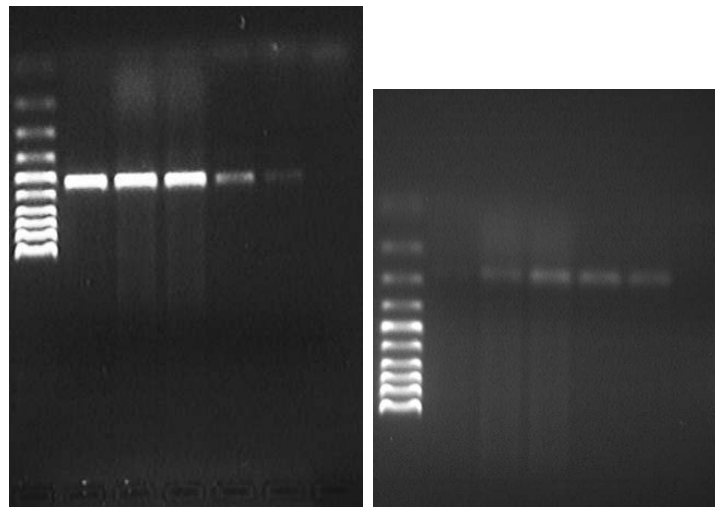


Abbildung 11

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den adulten Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für GAPDH und Albumin.

Von links nach rechts: Gene Ruler; GAPDH Tag 1, GAPDH Tag 3, GAPDH Tag 7, GAPDH Tag 14, GAPDH Leberstandard, GAPDH H<sub>2</sub>O; Alb Tag 14, Alb H<sub>2</sub>O, Alb Tag 3, Alb Tag 1, Alb Leberstandard, Alb Tag 7.



Abbildungen 12 und 13

Das linke Photo zeigt: PCR der aus den adulten Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für CK 18.

Von links nach rechts: Gene Ruler; CK 18 Tag 1, CK 18 Tag 3, CK 18 Tag 7, CK 18 Tag 14, CK 18 Leberstandard, CK 18 H<sub>2</sub>O.

Auf dem rechten Photo ist zu sehen: PCR der aus den adulten Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für CK 19.

Von links nach rechts: Gene Ruler; CK 18 Tag 14, CK 18 Tag 7, CK 18 Tag 3, CK 18 Tag 1, CK 18 Leberstandard, CK 18 H<sub>2</sub>O.

### 3.2.1.1 Tabellarische Zusammenfassung: PCR der adulten Zellen

<b>PCR-Ergebnisse adulte Hepatozyten</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	+	+	+	(+)
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	(+)

### 3.2.2 Thy1 negative fetale Hepatozyten

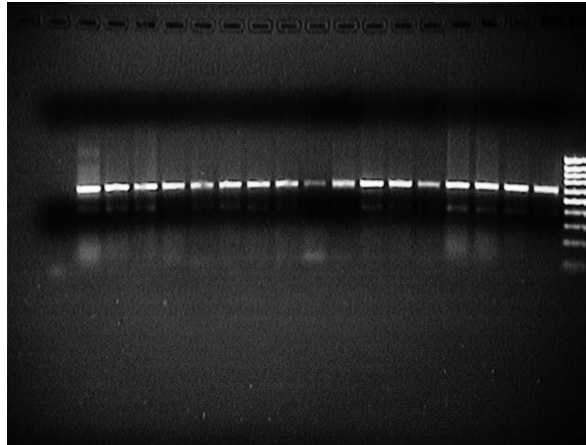


Abbildung 14

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für GAPDH.

Von links nach rechts: H<sub>2</sub>O, Leberstandard, ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1; ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1; ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1; ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

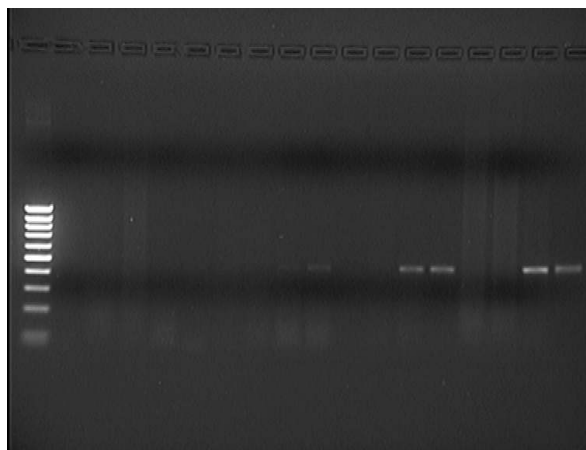


Abbildung 15

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für Albumin.

Von links nach rechts: Gene Ruler; H<sub>2</sub>O; nichts, nichts; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag

3, ED22-Tag 1; ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1; ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1; ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1.

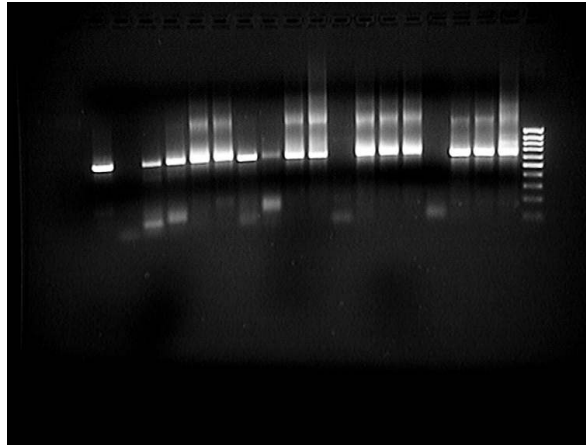


Abbildung 16

Das obige Photo zeigt: Nested PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für AFP.

Von links nach rechts: Leberstandard; H<sub>2</sub>O; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1; ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1; ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1; ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

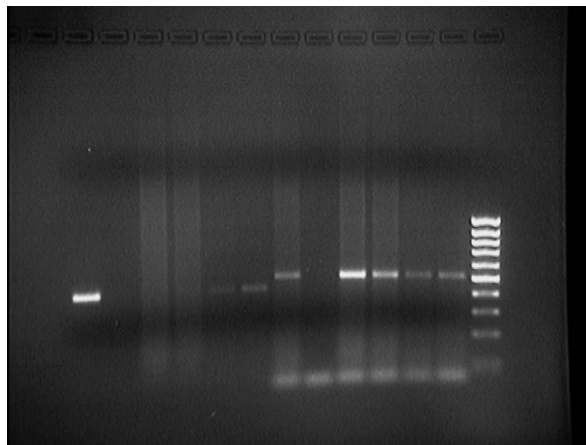


Abbildung 17

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für CK 18 und Albumin.

Von links nach rechts: Alb. Leberstandard; Alb. H<sub>2</sub>O; Alb. ED22-Tag 14, Alb. ED22-Tag 7, Alb. ED22-Tag 3, Alb. ED22-Tag 1; CK 18 ED22-Tag 14, CK18 ED22-Tag 7, CK 18 ED22-Tag 3, CK 18 ED22-Tag 1; Gene Ruler.

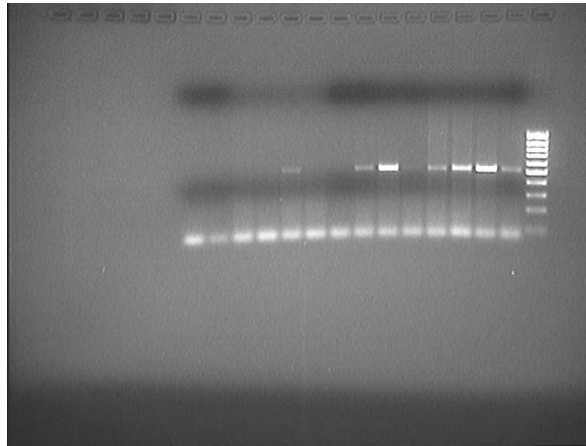


Abbildung 18

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für CK 18.

Von links nach rechts: Leberstandard; H<sub>2</sub>O; ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1, Gene Ruler.

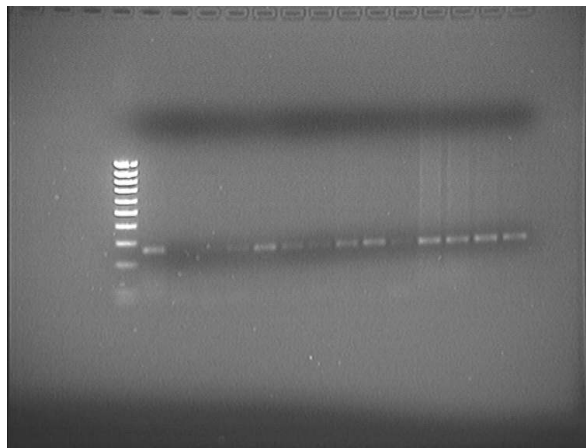


Abbildung 19

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für CK 19.



Von links nach rechts: Gene Ruler; Leberstandard; H<sub>2</sub>O; ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1.

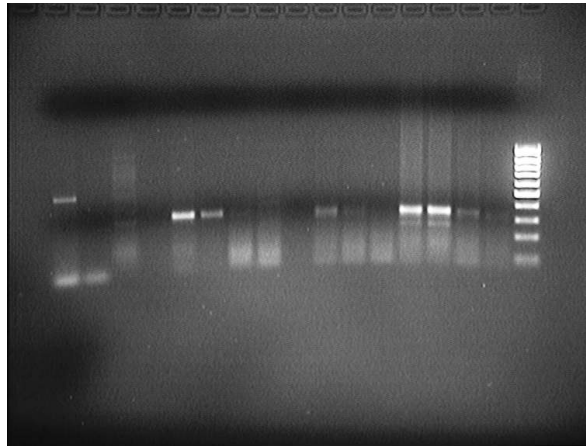


Abbildung 20

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für Thy1.

Von links nach rechts: Leberstandard, H<sub>2</sub>O; Nierenstandard, H<sub>2</sub>O; ED16-Tag 1, ED16-Tag 3, ED16-Tag 7, ED16-Tag 14, ED18-Tag 1, ED18-Tag 3, ED18-Tag 7, ED18-Tag 14, ED20-Tag 1, ED20-Tag 3, ED20-Tag 7, ED20-Tag 14; Gene Ruler.

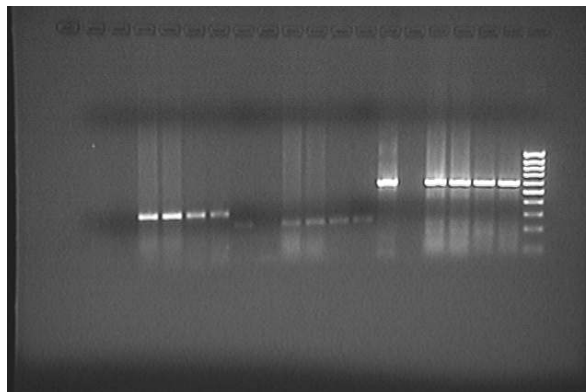


Abbildung 21

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 negativen fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für Thy1, CK 19 und GAPDH.

Von links nach rechts: Thy1 Leberstandard, Thy1 H<sub>2</sub>O, Thy1 ED22-Tag 14, Thy1 ED22-Tag 7, Thy1 ED22-Tag 3, Thy1 ED22-Tag 1; CK19 H<sub>2</sub>O, CK19 ED22-Tag 14, CK19 ED22-Tag 7, CK19 ED22-Tag 3, CK19 ED22-Tag 1; GAPDH H<sub>2</sub>O, GAPDH ED22-Tag 14, GAPDH ED22-Tag 7, GAPDH ED22-Tag 3, GAPDH ED22-Tag 1; Gene Ruler.

### 3.2.3 Thy1 positive fetale Hepatozyten

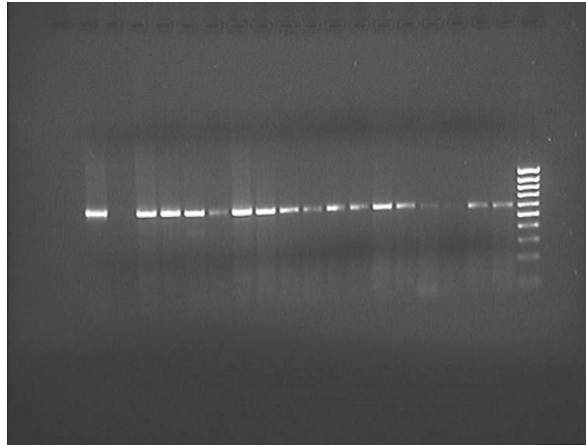


Abbildung 22

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 positiven fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für GAPDH.

Von links nach rechts: Leberstandard, H<sub>2</sub>O; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1, ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

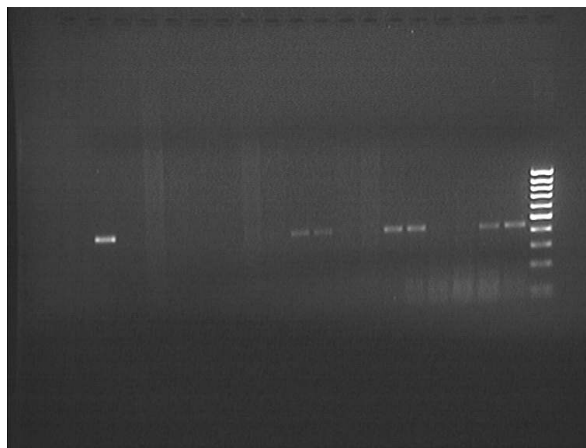


Abbildung 23

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 positiven fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für Albumin.

Von links nach rechts: Leberstandard, H<sub>2</sub>O; 4 leere Lanes; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1, ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14,

ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

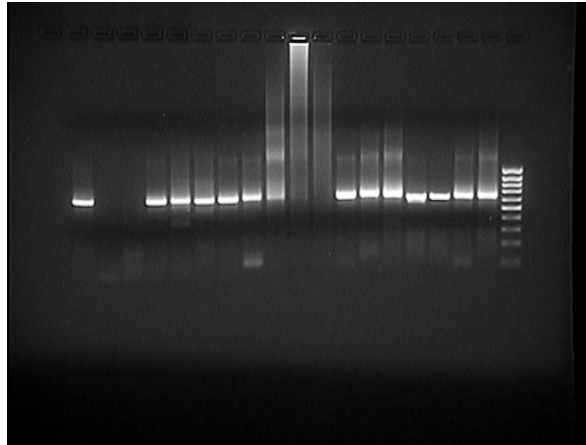


Abbildung 24

Das obige Photo zeigt: nested PCR der aus den Thy1 positiven fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für AFP.

Von links nach rechts: Leberstandard, H<sub>2</sub>O; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1, ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

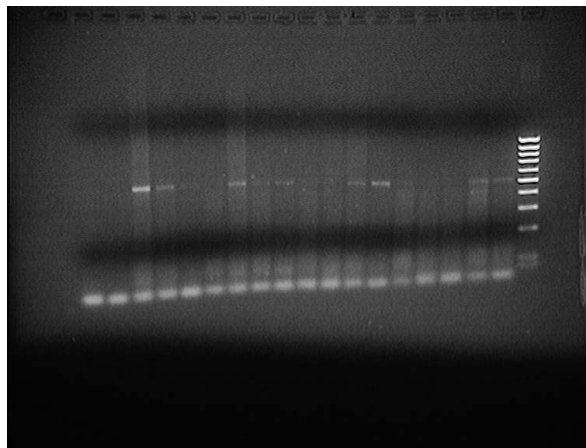


Abbildung 25

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 positiven fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für CK 18.

Von links nach rechts: Leberstandard, H<sub>2</sub>O; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1, ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

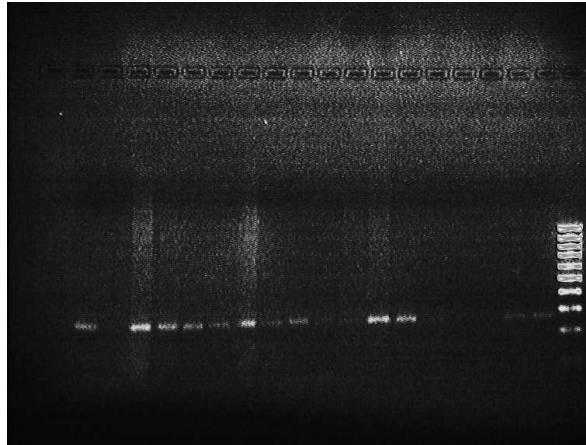


Abbildung 26

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 positiven fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für CK 19.

Von links nach rechts: Leberstandard, H<sub>2</sub>O; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1, ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

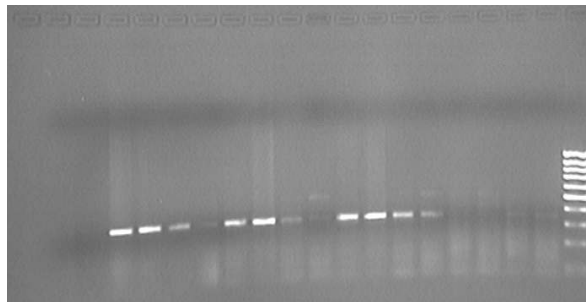


Abbildung 27

Das obige Photo zeigt: PCR der aus den Thy1 positiven fetalen Hepatozytenkulturen isolierten in cDNA umgeschriebenen mRNA für Thy1.

Von links nach rechts: Leberstandard, H<sub>2</sub>O; ED22-Tag 14, ED22-Tag 7, ED22-Tag 3, ED22-Tag 1, ED20-Tag 14, ED20-Tag 7, ED20-Tag 3, ED20-Tag 1, ED18-Tag 14, ED18-Tag 7, ED18-Tag 3, ED18-Tag 1, ED16-Tag 14, ED16-Tag 7, ED16-Tag 3, ED16-Tag 1; Gene Ruler.

## 3.2.4 Tabellarische Zusammenfassung: PCR der fetalen Zellen

## 3.2.4.1 Thy1 negative fetale Hepatozyten

<b>Thy1-negative fetale Hepatozyten, ED16</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>CD 90</b>	+	+	-	-

<b>Thy1-negative fetale Hepatozyten, ED18</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	+	+	+	+
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CK 18</b>	(+)	+	+	-
<b>CK 19</b>	(+)	+	+	(+)
<b>CD 90</b>	-	+	(+)	-

<b>Thy1-negative fetale Hepatozyten, ED20</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	(+)	(+)	-	-
<b>AFP</b>	+	+	(+)	+
<b>CK 18</b>	-	+	-	-
<b>CK 19</b>	(+)	+	+	(+)
<b>CD 90</b>	+	+	(+)	(+)

<b>Thy1-negative fetale Hepatozyten, ED22</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	(+)	(+)	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	+
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

## 3.2.4.2 Thy1 positive fetale Hepatozyten

<b>Thy1-positive fetale Hepatozyten, ED16</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	+
<b>CK 18</b>	+	+	-	-
<b>CK 19</b>	(+)	(+)	-	-
<b>CD 90</b>	(+)	(+)	-	-

<b>Thy1-positive fetale Hepatozyten, ED18</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CK 18</b>	(+)	+	+	(+)
<b>CK 19</b>	(+)	+	+	(+)
<b>CD 90</b>	(+)	+	+	+

<b>Thy1-positive fetale Hepatozyten, ED20</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	+
<b>CK 18</b>	(+)	+	+	+
<b>CK 19</b>	-	(+)	(+)	+
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

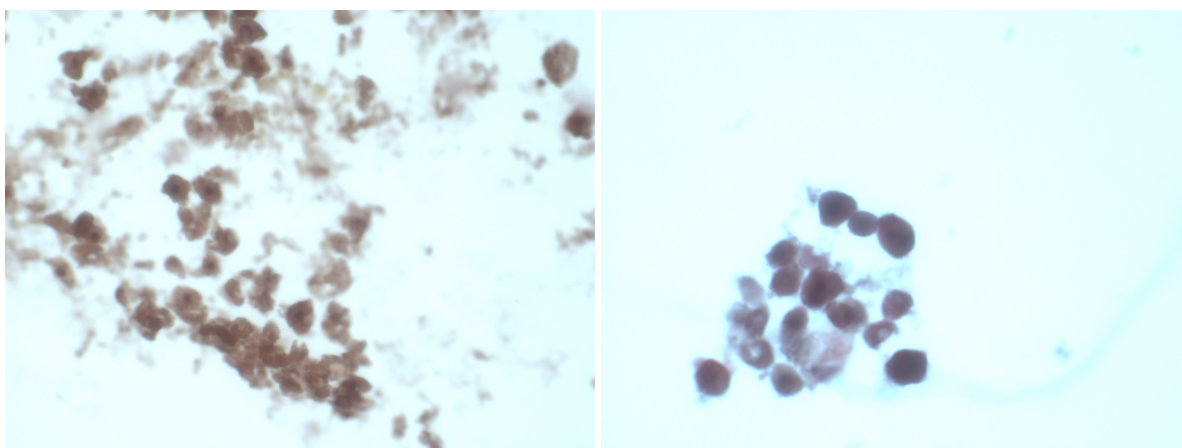
<b>Thy1-positive fetale Hepatozyten, ED22</b>				
	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
<b>GAPDH</b>	+	+	+	+
<b>Albumin</b>	-	-	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CK 18</b>	(+)	(+)	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

### 3.3 Ergebnisse der Immunhistochemie

Für sämtliche als mRNA nachgewiesene Marker wurde versucht, gleichfalls einen immunhistochemischen Nachweis der Proteinexpression zu erbringen.

An dieser Stelle werden nur einige exemplarische Bilder gezeigt. Für eine detaillierte Sammlung der Ergebnisse sei daher auf die Tabellen unter 3.3.1.1 und unter 3.3.2.1 verwiesen.

#### 3.3.1 adulte Hepatozyten

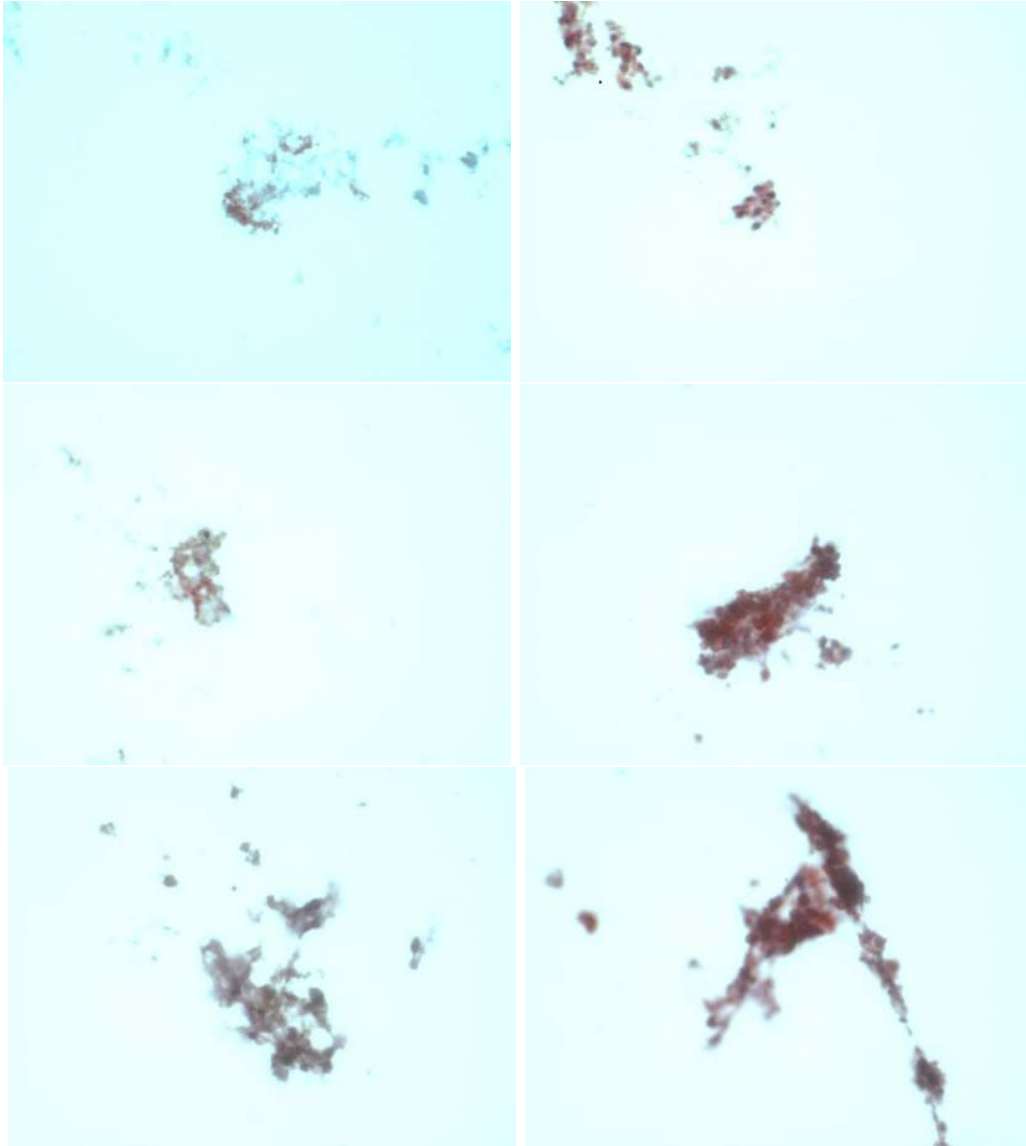


Abbildungen 28 und 29

Die obigen Bilder zeigen ein Photo der immunhistochemischen Auswertungen der adulten Hepatozytenkulturen an Kulturtag 7 für Albumin (linke Abbildung) und für CK 18 (rechte Abbildung).

##### 3.3.1.1 tabellarische Zusammenfassung

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (adulte H.)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	+	+
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	+

**3.3.2 fetale Hepatozyten**

Abbildungen 30 - 35

Die Photos zeigen die immunhistochemischen Auswertungen der Zellkulturen der Thy1 positiven fetalen Hepatozyten von ED16 an Kulturtag 7 für AFP (oben links), CK 18 (oben rechts) und Albumin (mitte links) sowie der Thy1 negativen fetalen Hepatozyten von ED16 an Kulturtag 7 für AFP (mitte rechts), CK 18 (unten links) und Albumin (unten rechts).



## 3.3.2.1 tabellarische Zusammenfassung

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1neg., ED 16)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	+	+
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	-	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CD 90</b>	+	-	-	-

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1neg., ED 18)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	+	+
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CD 90</b>	-	+	-	-

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1neg., ED 20)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>CK 18</b>	-	+	-	-
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1neg., ED 22)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>AFP</b>	+	+	+	+
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1pos., ED 16)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	+	-
<b>CK 18</b>	+	+	+	-
<b>CK 19</b>	+	+	-	-
<b>AFP</b>	+	+	+	+
<b>CD 90</b>	+	-	-	-

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1pos., ED 18)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>CK 18</b>	+	+	+	-
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>AFP</b>	+	+	+	-
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1pos., ED 20)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	+	+	-	-
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	-	+	+	+
<b>AFP</b>	+	+	+	+
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

<b>Ergebnisse der Immunhistochemie (Thy1pos., ED 22)</b>				
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 3</b>	<b>Tag 7</b>	<b>Tag 14</b>
<b>Albumin</b>	-	-	-	-
<b>CK 18</b>	+	+	+	+
<b>CK 19</b>	+	+	+	+
<b>AFP</b>	-	-	-	-
<b>CD 90</b>	+	+	+	+

## 4 Diskussion

### 4.1 Vergleich der Wachstumskinetik

#### 4.1.1 fetaler und adulter Hepatozyten

Die adulten Hepatozyten zeigen eine fast gleichbleibende Zellzahl über den gesamten Zeitraum der Zellkultur. In der zweiten Hälfte der Kulturperiode zeigt sich eine leichte Abnahme der Zellzahl. Dies entspricht dem bekannten Verhalten adulter Hepatozyten *in vitro*. Allerdings ist das Wachstumspotential adulter Hepatozyten stark von den Kulturbedingungen abhängig [89], [44], [8], [7]. Dagegen zeigen sowohl die Thy1 negativen als auch die Thy1 positiven fetalen Leberzellen an ED16 eine Zunahme der Zellzahl über den gesamten Zeitraum der Zellkultur hinweg. Die an ED18 isolierten fetalen Leberzellen zeigen im Fall der Thy1 positiven Zellen eine Zunahme der Zellzahl. Im Fall der Thy1 negativen Zellen zeigen sie eine Abnahme der Zellzahl bis zum Ende der Zellkultur. Auffällig ist an den Zellzahlen der Kulturen von ED18 eine Zunahme der Thy1 negativen Zellen von Kulturtag 3 an. Die Zahl der in der Kultur befindlichen lebenden Zellen von ED20 dagegen nimmt bei beiden untersuchten Zelllinien insgesamt ab.

Die Zellzahl der an ED22 isolierten Thy1 negativen und besonders der Thy1 positiven fetalen Zellen dagegen zeigt eine starke Zunahme der Zellzahl. Bei der Interpretation der Ergebnisse der ED22-Zellen muss in Betracht gezogen werden, dass es sich hierbei um einen durch Verunreinigung durch blutbildende Zellen hervorgerufenen Effekt handeln könnte. Auf diesen Punkt wird im nächsten Abschnitt noch genauer eingegangen werden.

Von ED16 bis ED20 sieht man eine Abnahme der Proliferation sowohl der Thy1 negativen als auch der Thy1 positiven Zellen. Dies kann ein Hinweis auf eine Reifung der untersuchten Zellen zum Ende der Fetalperiode hin sein.

Abgesehen von den Ergebnissen von ED22 scheint die Wachstumskinetik beider Zelltypen insgesamt mit dem Näherrücken des Geburtstermins der der adulten Hepatozyten immer ähnlicher zu werden. Dies ist sicherlich auch zu erwarten.

#### 4.1.2 Thy1 positiver und negativer Hepatozyten

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Wachstumskinetik Thy1 positiver und Thy1 negativer Zellen aller Embryonalstage *in vitro* signifikant unterscheidet. Die Thy1 positiven Zellen der frühen Fetalperiode zeigen mit einer Zunahme der Zellzahl auf mehr als 1600% ein enormes Wachstumspotenzial. Dieses liegt signifikant höher als das der Thy1 negativen

Zellen der frühen fetalen Leber. Zwar nahm das Wachstumspotenzial beider Zellen bis ED20 deutlich ab, dennoch blieb das Wachstumspotenzial der Thy1 positiven Zellen bis zum Ende der Fetalperiode signifikant höher.

Die Ergebnisse der Kulturen von ED22 sind nur vorsichtig zu interpretieren. Da die Leber gegen Ende der Fetalperiode stark an der Blutbildung beteiligt ist [30], [38], ist es möglich, dass das zur Aufreinigung der Leberzellen verwendete MACS-System überlastet wurde. Bei den untersuchten Zellen könnte es sich größtenteils um hämatopoetische Zellen mit ausgeprägtem Proliferationsverhalten handeln. Zu dieser Überlegung passt auch der sehr deutliche Nachweis von Thy1 positiven Zellen in den Kulturen der Thy1 negativ gesorteten Zellen von ED22 und ein deutlich stärkeres Wachstum der Thy1 positiv gesorteten Zellen im Vergleich zu den Thy1 negativ gesorteten Zellen. Darüber hinaus weist der schwächere Nachweis leberspezifischer Marker - hierzu sei auf die entsprechende Tabelle unter 3.2.4.2 verwiesen - in den Kulturen von ED22 bei hoher Zellzahl auf eine Überwucherung mit anderen Zellen hin. Da es sich bei Thy1 um einen Marker hämatopoetischer Zellen handelt [59], [45], [12], muss der Anteil der blutbildenden Zellen zwangsläufig unter den Thy1 positiv gesorteten Zellen höher sein.

Dass dennoch in den Kulturen qualitativ leberspezifische Marker nachgewiesen werden konnten, zeigt, dass es in den Zellkulturen zumindest einen Anteil von Leberzellen gegeben haben muss.

## 4.2 Untersuchung der Markerexpression

### 4.2.1 der adulten Hepatozyten

Die aus der adulten Leber isolierten Zellen zeigen in vitro eine Expression sowohl leberspezifischer als auch für Gallengangsepithelien typischer Marker. Da eine Aufreinigung der Zellen nur mittels Gradientenzentrifugation erfolgte, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Kulturen beider Zelltypen.

### 4.2.2 Thy1 positiver und negativer Hepatozyten

Sowohl die Thy1 negativen als auch die Thy1 positiven isolierten Leberzellen zeigen in allen Kulturen von allen untersuchten Zeitpunkten der Fetalperiode an zumindest einem Tag der Zellkultur eine in der PCR und Immunhistochemie nachgewiesene Expression sowohl der leberspezifischen Marker Albumin, AFP und CK18 als auch eine Expression des Gallengangsepithelmarkers CK19. Dies kann zunächst als Hinweis auf eine prinzipielle Fähigkeit

beider Zelltypen gewertet werden, sich in vitro sowohl in Hepatozyten als auch in Gallengangsepithelzellen zu differenzieren. Während die Thy1 negativen Zellen bis zum Ende der Fetalperiode in den Zellkulturen ein Fortbestehen der Albumin und AFP Expression zeigen, ist diese in den Thy1 positiven Zellkulturen von ED22 nicht mehr gegeben. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine weitere Reifung der Thy1 negativen Zellen zu Hepatozyten bis zum Zeitpunkt der Geburt. Gleichzeitig könnte dies auf eine Entdifferenzierung der Thy1 positiven Zellen in einen eventuell weiter in der adulten Leber bestehenden anderen Zelltyp mit potentiell stammzellähnlichen Eigenschaften hinweisen. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen, die aus dieser Arbeit vorangehenden Experimenten gewonnen werden konnten [28].

Die Zellkulturen der zum Ende der Fetalperiode isolierten Thy1 negativen und Thy1 positiven Zellen zeigen alle eine Expression von Thy1. Da es sich bei Thy1 um einen bekannten Marker hämatopoetischer Zellen handelt und die fetale Leber zum Ende der Fetalperiode mehr und mehr Aufgaben der Blutbildung übernimmt, besteht die Möglichkeit, dass es sich hierbei um ein durch Verunreinigungen mit diesen Zellen zustande gekommenes Phänomen handelt. Die Methode der Zellaufreinigung mit MACS hat sich zwar in Vorarbeiten wie auch bei der Aufreinigung anderer Zellen als sehr effektiv erwiesen [28], [63], [10], [39], [49], ist aber vielleicht einer Verunreinigung mit einem so großen Anteil blutbildender Zellen nicht gewachsen. Bereits bei kleineren Kontaminationen der Zellkultur mit expansiv wachsenden Zellen kann es zu Überwucherungsphänomenen kommen.

### 4.3 Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit

Die Thy1 positiven und Thy1 negativen Zellen zeigen in vitro ein von den adulten unterschiedliches Wachstumspotenzial. Außerdem zeigen die Thy1 positiven Zellen in vitro zu allen Zeitpunkten ein signifikant höheres Wachstumspotenzial im Vergleich zu den Thy1 negativen Zellen. Die fetalen Zellen tragen sowohl Marker von Leberzellen als auch von Gallengangsepithelien.

Interessant an den Thy1 positiven Zellen ist, dass in der adulten Leber bereits Oval Cells beschrieben wurden, die diesen Marker exprimieren [67], [52], [101]. Nachdem die Rattenlebern AAF und CCl<sub>2</sub> ausgesetzt worden waren, konnten Oval Cells gefunden werden, die Thy1 exprimierten.

Für die fetale Rattenleber sind bereits unterschiedliche Zelltypen beschrieben worden. Es konnten fetale Leberzellen gezeigt werden, die einen Oval Cell Marker trugen und solche, die ihn nicht trugen. Bei diesen wurde allerdings nicht Thy1, sondern der Marker adulter Oval

Cells OC.3 [77], [24], [1] nachgewiesen. Im Gegensatz zu Thy1 wird OC.3 nicht nur auf Oval Cells, sondern auch auf anderen Zellen des regenerierenden Lebergewebes wie z.B. Gallengangsepithelzellen exprimiert.

In dieser Arbeit konnten zwei Typen von fetalen Leberzellen untersucht werden, von denen eine mit Thy1 ebenfalls einen von adulten Oval Cells her bekannten Marker exprimiert. Da es sich bei Thy1 darüber hinaus auch um einen Marker der hämatopoetischen Zellen handelt, liegt die Vermutung nahe, dass eine engere Verwandtschaft zwischen blutbildenden Zellen und Leberzellen als bisher angenommen besteht. Der Ort der Blutbildung in der Fetalperiode könnte nicht rein aufgrund räumlicher Bedingungen zu erklären sein, sondern aufgrund bisher nicht abschliessend geklärter Beziehungen zwischen den unterschiedlichen Zelltypen [87].

Mit dem Näherrücken des Geburtstermins nimmt das Wachstumspotenzial sowohl der Thy1 negativen als auch der Thy1 positiven Zellen ab. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein, die den Zusammenhang zwischen Differenzierung und Wachstumspotenzial von an ED19 und ED21 isolierten Rattenhepatozyten *in vitro* untersucht hatten [35], [40]. Es wurde ein höherer BrdU-Markierungsindex bei an ED19 isolierten Zellen im Vergleich zu an ED21 isolierten Zellen gefunden [35]. Ein höherer Differenzierungsgrad scheint mit einem geringeren Wachstumspotenzial verknüpft zu sein.

Die Ergebnisse von ED22 sind aus den zuvor bereits erwähnten Gründen nur eingeschränkt interpretierbar. Sicher ist, dass es sich um Kulturen handelte, in denen Leberzellen enthalten waren, da eine Expression leberspezifischer Marker nachgewiesen werden konnte. Da die Wachstumskinetik insbesondere der Thy1 positiven Zellen anders als mit zur Geburt hin zunehmender Reife der Leberzellen eine ausgesprochene Zunahme der Zellzahl zeigt und auch die Thy1 negativ gesorteten Zellen an allen Kulturtagen eine Expression des hämatopoetischen Lineagemarkers Thy1 zeigen, kann hier als nahe liegende Ursache eine Verunreinigung mit hämatopoetischen Zellen vermutet werden.

Immunhistochemisch und in der RT-PCR Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl Thy1 positive als auch Thy1 negative Zellen leberspezifische Marker exprimieren. Zusammengefasst fand sich ein Genexpressionsprofil mit einer kontinuierlichen AFP-Expression und einer über die Zeit der Zellkultur abnehmenden Albumin- und CK18-Expression, was einem Verlust von Lebereigenschaften der Zellen *in vitro* während der Zellkultur entsprechen könnte. Hier konnten kaum Unterschiede zwischen Thy1 negativen und Thy1 positiven Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine schwächere Genexpression von CK18 und Albumin bei beiden an ED16 isolierten Zelltypen gefunden, verglichen mit denen, die an ED18 und ED20 isoliert wurden. Da die RT-PCR nur semiquantitative Ergebnisse liefert, muss dieses Ergebnis

mit äußerster Vorsicht betrachtet werden - der beobachtete Trend könnte durch eine größere Verunreinigung der Zellen mit Nicht-Leberzellen bei den Isolaten aus Lebergewebe der späten Fetalperiode zustande kommen. Insgesamt zeigen die Daten eine Differenzierung beider Zelltypen in Lebergewebe zu Beginn der Kulturperiode und einen Verlust der Leberdifferenzierung gegen Ende der Zellkultur.

Die Differenzierung der Zellen wird möglicherweise stärker durch die (gleichen) Kulturbedingungen beeinflusst als durch unterschiedliche Eigenschaften der kultivierten Zelltypen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren, die einen starken Einfluss der Kulturbedingungen auf die Differenzierung fetaler Leberzellen und Leberstammzellen zeigen konnten [99], [98]. Es konnte in anderen Arbeiten der Effekt bestimmter Zusätze zum Kulturmedium auf die kultivierten Zellen gezeigt werden. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hydrocortison die Albuminsynthese unterdrückte und die AFP-Synthese der fetalen Leberzellen *in vitro* verlängerte [29]. Auch der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Zellmorphologie und Genexpression der fetalen Hepatozyten in Zellkulturen darf nicht unterschätzt werden [9]. In einer Studie konnte ein starker positiver Einfluss einer Fibronectinmatrix auf die leberspezifische Genexpression und Zellorganisation fetaler Rattenhepatozyten *in vitro* gezeigt werden [78].

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Leberzellen, die aus embryonalen bzw. fetalen Lebern an ED12 und ED16 isoliert wurden, abhängig von den Kulturbedingungen entweder in die Richtung hepatischer oder biliärer Zelllinien differenzieren [33].

In dieser Arbeit zeigen beide untersuchte fetale Zelltypen *in vitro* eine leberspezifische Differenzierung. Die Daten zeigen, dass im Gegensatz zur Differenzierungsfähigkeit das Wachstumspotenzial sehr stark vom Zelltyp abhängt und nicht so sehr von den Kulturbedingungen. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Thy1 positiven fetalen Leberzellen *in vitro* eine Fähigkeit zur Differenzierung in hepatische Zellen besitzen, die Hepatoblasten vergleichbar ist. Das enorme Wachstumspotenzial der Thy1 positiven Zellen *in vitro* deutet auf ein stammzellähnliches Wachstumspotenzial hin.

#### 4.4 Antworten auf die formulierten Fragestellungen

Zusammenfassend kann zu den unter 1.3 formulierten Fragen erklärt werden:

MACS erwies sich als eine geeignete Methode, um Thy1 positive von negativen Zellen zu trennen, solange nicht, wie wahrscheinlich an Tag 22 geschehen, die Methode überlastet wurde.

Bei den Thy1 positiven und negativen Zellen handelt es sich um zwei deutlich unterschiedliche Zelllinien, die jedoch beide gleichermaßen hepatische Marker exprimieren. Neben der Expression der hepatischen Marker auf mRNA und Proteinebene zeichnet sich die Thy1 positive Zelle durch die Expression des Stammzellmarkers Thy1 aus.

Während beide fetale Zelltypen in der Wachstumskinetik gegenüber den adulten Hepatozyten durchgehend ein signifikant höheres Wachstumspotential zeigten, zeigten die Thy1 positiven Zellen darüberhinaus auch gegenüber den Thy1 negativen Zellen ein signifikant höheres Wachstumspotential.

#### 4.5 Sich aus dieser Arbeit ergebende Fragen

Die in dieser Arbeit beantworteten Fragen müssen in weiterführenden Arbeiten genauer geklärt werden. Zur Interpretation der hier erhobenen Daten muss untersucht werden, ob es sich bei den von Sigal et al gefundenen OC.3-positiven fetalen Hepatozyten [77] um den gleichen Zelltyp wie den in dieser Arbeit untersuchten Thy1 positiven Typ der fetalen Hepatozyten handelt. Denkbar ist auch, dass dies einen dritten Typ von Zellen darstellt. Ungeklärt ist auch die Frage, was mit den Thy1 positiven Zellen in der adulten Leber geschieht; es wäre möglich, dass eine enge Verwandtschaft mit den Oval Cells der adulten Leber besteht, dass es sich hierbei um einen anderen, bisher nicht in Betracht gezogenen oder bisher unbekanntem Zelltyp handelt oder dass diese Zellen nur in der fetalen Leber existieren und in der adulten Leber keine Funktion mehr übernehmen oder in Apoptose gehen.

Darüber hinaus bleiben die in dieser Arbeit für die an ED22 isolierten Zellen gefundenen Ergebnisse unklar, auch wenn es wahrscheinlich erscheint, dass diese durch eine Verunreinigung mit hämatopoetischen Zellen entstanden sind.

Weitere Experimente müssen auch die Differenzierungsfähigkeit der Thy1 positiven Zellen in Richtung Gallengangsepithelzellen klären.

Möglicherweise kann die Thy1 positive fetale Leberzelle als Modell der adulten Oval Cell dienen; weitere Untersuchungen müssen auch klären, ob ein Einsatz dieser fetalen Thy1 positiven Leberzelle im Bereich des Tissue Engineering sinnvoll ist.



## Zusammenfassung

Aus der fetalen Rattenleber konnten zwei verschiedene Typen von Leberzellen isoliert werden: Solche, die sowohl typische Marker von Leberzellen trugen wie Albumin, CK18 und AFP und zusätzlich den von hämatopoetischen Zellen und Oval Cells der adulten Leber her bekannten Marker Thy1 und solche, die typische Marker von Leberzellen trugen, aber nicht positiv für Thy1 waren.

Aus den Lebern fetaler Sprague-Dawley Ratten der Embryonalstage 16, 18, 20 und 22 wurden Leberzellen aufgereinigt und separiert und anschließend über 14 Tage unter gleichen Bedingungen kultiviert. An den Kulturtagen 1, 3, 7 und 14 wurde unter standardisierten Bedingungen die Zellzahl ermittelt. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurde mRNA aus den Zellkulturen isoliert und die Expression leberspezifischer Marker mittels RT-PCR untersucht. Ein immunhistochemischer Nachweis der Markerexpression wurde ebenfalls durchgeführt.

Zum Vergleich wurden außerdem Hepatozyten aus adulten Rattenlebern gewonnen, über 14 Tage kultiviert und hinsichtlich ihrer Wachstumskinetik und der Expression lebertypischer Marker untersucht. Es ergaben sich aus diesen Untersuchungen folgende *in vitro* Daten:

- Die Markerexpression der Thy1 positiven und Thy1 negativen fetalen Leberzellen ist während der gesamten Kulturzeit, unabhängig von der Reife der Zellen, ähnlich.
- Die Wachstumskinetik der Thy1 positiven fetalen Leberzellen zeigt im Vergleich zu den Thy1 negativen fetalen Leberzellen ein signifikant höheres Wachstum.
- Beide Typen fetaler Zellen zeigen ein signifikant höheres Wachstum als die adulten Hepatozyten.

Die *in vitro* Daten dieser Arbeit zeigen ein stammzellähnliches Wachstumsverhalten der Thy1 positiven fetalen Rattenleberzelle. Das Markerprofil dieser Zelle ähnelt dem der Oval Cell der adulten Leber. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Thy1 positiven fetalen Rattenleberzelle um eine Zelle handelt, die eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Leber und eventuell auch der Leberregeneration spielen könnte. Diese Daten machen darüber hinaus auch eine zielgerichtete Untersuchung der Expression von Gallengangsepithelienmarkern der Thy1 positiven Zellen möglich, um so einen weiteren Nachweis der Stammzeleigenschaften dieses fetalen Zelltyps führen zu können.

Da sich Gewinnung und Kultur der Thy1 positiven fetalen Rattenleberzelle als ungleich einfacher als der adulten Oval Cell der Rattenleber erwiesen haben, ist ein möglicher Einsatz dieses fetalen Zelltypes als Modell der adulten Oval Cell denkbar.

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungen, soweit im Text nicht erklärt:

°C:	Grad Celsius
AAF:	Acetylaminofluoren
Abb:	Abbildung(en)
AFP:	Alphafetoprotein
Alb:	Albumin
APAAP:	alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase
BrdU:	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA:	Bovines Serum Albumin
CD:	Cluster of Differentiation
cDNA:	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CK:	Cytokeratin
DNTP:	Deoxynucleotide Triphosphate
ED:	Embryonal Day
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGF:	Epidermal Growth Factor
EGTA:	Ethylene Glycol Bis-2-Aminoethyl Ether-N,N',N'',n'-Tetraacetic Acid
FCS:	Fetal Calf Serum
FITC:	Fluorescein Isothiocyanate
FLEC:	Fetal Liver Epithelial Cell
g/ml:	Gramm pro Milliliter
GAPDH:	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HBSS:	Hanks Buffered Saline Solution
Hepes:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethanesulfonsäure
HRP:	Horserradishperoxidase
IE:	Internationale Einheiten
Ig:	Immunglobulin Gamma
mAb:	Monoklonaler Antikörper

mg:	Milligramm
$\mu\text{g}$ :	Mikrogramm
ml:	Milliliter
$\mu\text{l}$ :	Mikroliter
mm:	Millimeter
$\text{mm}^2$ :	Quadratmillimeter
$\mu\text{m}$ :	Mikrometer
mRNA:	Messenger Ribonucleic Acid
OC:	Oval Cell
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR:	Polymerase Chain Reaction
rpm:	Round Per Minute
RT-PCR:	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
s:	Sekunde(n)
TAE:	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq Polymerase:	Thermus Aquaticus Polymerase
U/min:	Umdrehungen pro Minute

## Abbildungsverzeichnis

Unter 1.1: Abb. 1: Peter Paul Rubens: "Gefesselter Prometheus". Quelle: Wikimedia Foundation.

Unter 1.1.1: Abb. 2: Schema zur Embryogenese der Leber nach Blechschmidt. Eigene Graphik.

Unter 2.1: Abb. 3: Ablauf der Experimente. Eigene Graphik.

Unter 2.5.1: Abb. 4: Photo während der Präparation einer adulten Leber. Eigenes Photo.

Unter 2.5.2: Abb. 5: Photo während der Präparation einer fetalen Leber. Eigenes Photo.

Unter 3.1.1.1: Abb. 6: Wachstumskinetik der adulten Hepatozyten. Eigenes Diagramm.

Unter 3.1.3: Abb. 7 - 10: Wachstumskinetik der fetalen Zellen von ED16, ED18, ED20 und ED22. Eigene Diagramme.

Unter 3.2.1: Abb. 11-13: Photos der PCR der adulten Hepatozyten. Eigene Photos.

Unter 3.2.2: Abb. 14-21: Photos der PCR der Thy1 negativen fetalen Hepatozyten. Eigene Photos.

Unter 3.2.3: Abb. 22-27: Photos der PCR der Thy1 positiven fetalen Hepatozyten. Eigene Photos.

Unter 3.3.1: Abb. 28-29: Immunhistochemie der adulten Hepatozyten. Eigene Photos.

Unter 3.3.2: Abb. 30-32: Immunhistochemie der Thy1 positiven Hepatozyten. Eigene Photos.

Unter 3.3.3: Abb. 33-35: Immunhistochemie der Thy1 negativen Hepatozyten. Eigene Photos.

---

## Literatur

- [1] AGELLI, M. ; SBARBA, P. D. ; HALAY, E. D. ; FARIS, R. A. ; HIXSON, D. E. ; REID, L. M.: Putative liver progenitor cells: conditions for long-term survival in culture. In: *Histochem J* 29 (1997), Mar, Nr. 3, S. 205–217
- [2] ALISON, M. R. ; POULSOM, R. ; JEFFERY, R. ; DHILLON, A. P. ; QUAGLIA, A. ; JACOB, J. ; NOVELLI, M. ; PRENTICE, G. ; WILLIAMSON, J. ; WRIGHT, N. A.: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. In: *Nature* 406 (2000), Jul, Nr. 6793, S. 257
- [3] ALISON, M. R. ; VIG, P. ; RUSSO, F. ; BIGGER, B. W. ; AMOFAH, E. ; THEMIS, M. ; FORBES, S.: Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? In: *Cell Prolif* 37 (2004), Feb, Nr. 1, S. 1–21
- [4] AUERBACH, R. ; HUANG, H. ; LU, L.: Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. In: *Stem Cells* 14 (1996), May, Nr. 3, S. 269–280
- [5] AVITAL, Itzhak ; FERARESSO, Chiara ; AOKI, Takeshi ; HUI, Thomas ; ROZGA, Jacek ; DEMETRIOU, Achilles ; MURACA, Maurizio: Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection. In: *Surgery* 132 (2002), Aug, Nr. 2, S. 384–390
- [6] BARKER, J. E. ; KEENAN, M. A. ; RAPHALS, L.: Development of the mouse hematopoietic system. II. Estimation of spleen and liver stem cell number. In: *J Cell Physiol* 74 (1969), Aug, Nr. 1, S. 51–56
- [7] BLAHETA, R. A. ; KRONENBERGER, B. ; WOITASCHEK, D. ; AUTH, M. K. ; SCHOLZ, M. ; WEBER, S. ; SCHULDES, H. ; ENCKE, A. ; MARKUS, B. H.: Dedifferentiation of human hepatocytes by extracellular matrix proteins in vitro: quantitative and qualitative investigation of cytokeratin 7, 8, 18, 19 and vimentin filaments. In: *J Hepatol* 28 (1998), Apr, Nr. 4, S. 677–690
- [8] BLOCK, G. D. ; LOCKER, J. ; BOWEN, W. C. ; PETERSEN, B. E. ; KATYAL, S. ; STROM, S. C. ; RILEY, T. ; HOWARD, T. A. ; MICHALOPOULOS, G. K.: Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. In: *J Cell Biol* 132 (1996), Mar, Nr. 6, S. 1133–1149

- [9] BRILL, Shlomo ; ZVIBEL, Isabel ; HALPERN, Zamir ; OREN, Ran: The role of fetal and adult hepatocyte extracellular matrix in the regulation of tissue-specific gene expression in fetal and adult hepatocytes. In: *Eur J Cell Biol* 81 (2002), Jan, Nr. 1, S. 43–50
- [10] BÜSCH, J. ; HUBER, P. ; PFLÜGER, E. ; MILTENYI, S. ; HOLTZ, J. ; RADBRUCH, A.: Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis. In: *Prenat Diagn* 14 (1994), Dec, Nr. 12, S. 1129–1140
- [11] CLAPP, D. W. ; FREIE, B. ; LEE, W. H. ; ZHANG, Y. Y.: Molecular evidence that in situ-transduced fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells give rise to medullary hematopoiesis in adult rats. In: *Blood* 86 (1995), Sep, Nr. 6, S. 2113–2122
- [12] CORCELLE, V. ; STIEGER, B. ; GJINOVCI, A. ; WOLLHEIM, C. B. ; GAUTHIER, B. R.: Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins. In: *Exp Cell Res* 312 (2006), Sep, Nr. 15, S. 2826–2836
- [13] COUCHIE, Dominique ; HOLIC, Nathalie ; CHOBERT, Marie-Noële ; CORLU, Anne ; LAPERCHE, Yannick: In vitro differentiation of WB-F344 rat liver epithelial cells into the biliary lineage. In: *Differentiation* 69 (2002), Jan, Nr. 4-5, S. 209–215
- [14] CRAIG, W. ; KAY, R. ; CUTLER, R. L. ; LANSDORP, P. M.: Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. In: *J Exp Med* 177 (1993), May, Nr. 5, S. 1331–1342
- [15] CROSBY, H. A. ; KELLY, D. A. ; STRAIN, A. J.: Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. In: *Gastroenterology* 120 (2001), Feb, Nr. 2, S. 534–544
- [16] CROSBY, H. A. ; STRAIN, A. J.: Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived? In: *Gut* 48 (2001), Feb, Nr. 2, S. 153–154
- [17] DABEVA, M. D. ; PETKOV, P. M. ; SANDHU, J. ; OREN, R. ; LACONI, E. ; HURSTON, E. ; SHAFRITZ, D. A.: Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. In: *Am J Pathol* 156 (2000), Jun, Nr. 6, S. 2017–2031

- 
- [18] DAHLKE, Marc H. ; POPP, Felix C. ; LARSEN, Stephen ; SCHLITT, Hans J. ; RASKO, John E J.: Stem cell therapy of the liver—fusion or fiction? In: *Liver Transpl* 10 (2004), Apr, Nr. 4, S. 471–479
- [19] DHAWAN, Anil ; MITRY, Ragai R. ; HUGHES, Robin D.: Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. In: *J Inherit Metab Dis* 29 (2006), Nr. 2-3, S. 431–435
- [20] DOUARIN, N. M.: An experimental analysis of liver development. In: *Med Biol* 53 (1975), Dec, Nr. 6, S. 427–455
- [21] EVARTS, R. P. ; NAGY, P. ; MARSDEN, E. ; THORGEIRSSON, S. S.: A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. In: *Carcinogenesis* 8 (1987), Nov, Nr. 11, S. 1737–1740
- [22] EVARTS, R. P. ; NAGY, P. ; NAKATSUKASA, H. ; MARSDEN, E. ; THORGEIRSSON, S. S.: In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. In: *Cancer Res* 49 (1989), Mar, Nr. 6, S. 1541–1547
- [23] FARBER, E.: Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. In: *Cancer Res* 16 (1956), Feb, Nr. 2, S. 142–148
- [24] FARIS, R. A. ; MONFILS, B. A. ; DUNSFORD, H. A. ; HIXSON, D. C.: Antigenic relationship between oval cells and a subpopulation of hepatic foci, nodules, and carcinomas induced by the "resistant hepatocyte" model system. In: *Cancer Res* 51 (1991), Feb, Nr. 4, S. 1308–1317
- [25] FAUSTO, N.: Liver regeneration. In: *J Hepatol* 32 (2000), Nr. 1 Suppl, S. 19–31
- [26] FIEGEL, H. C. ; LANGE, Claudia ; KNESER, U. ; LAMBRECHT, W. ; ZANDER, A. R. ; ROGIERS, X. ; KLUTH, D.: Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering. In: *J Cell Mol Med* 10 (2006), Nr. 3, S. 577–587
- [27] FIEGEL, Henning C. ; LIOZNOV, Michael V. ; CORTES-DERICKS, Lourdes ; LANGE, Claudia ; KLUTH, Dietrich ; FEHSE, Boris ; ZANDER, Axel R.: Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. In: *Stem Cells* 21 (2003), Nr. 1, S. 98–104
- [28] FIEGEL, Henning C. ; PARK, Jonas J. ; LIOZNOV, Michael V. ; MARTIN, Andreas ; JAESCHKE-MELLI, Stefan ; KAUFMANN, Peter M. ; FEHSE, Boris ; ZANDER, Axel R.

- ; KLUTH, Dietrich: Characterization of cell types during rat liver development. In: *Hepatology* 37 (2003), Jan, Nr. 1, S. 148–154
- [29] FREEMAN, A. E. ; ENGVALL, E. ; HIRATA, K. ; YOSHIDA, Y. ; KOTTEL, R. H. ; HILBORN, V. ; RUOSLAHTI, E.: Differentiation of fetal liver cells in vitro. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (1981), Jun, Nr. 6, S. 3659–3663
- [30] FUJIKURA, Y. ; KUNIKI, H. ; FUKUMOTO, T.: Analysis of hemopoietic cells in rat bone marrow and fetal liver with monoclonal antibody. In: *Dev Comp Immunol* 14 (1990), Nr. 1, S. 121–129
- [31] FUJIO, K. ; EVARTS, R. P. ; HU, Z. ; MARSDEN, E. R. ; THORGEIRSSON, S. S.: Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. In: *Lab Invest* 70 (1994), Apr, Nr. 4, S. 511–516
- [32] GENNERO, Luisa ; MORTIMER, Philip ; SPERBER, Kirk ; CARLONI, Guido ; PONZETTO, Antonio: Stem cells: an alternative to organ transplantation in chronic, degenerative and infectious diseases? In: *New Microbiol* 29 (2006), Jul, Nr. 3, S. 151–167
- [33] GERMAIN, L. ; BLOUIN, M. J. ; MARCEAU, N.: Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. In: *Cancer Res* 48 (1988), Sep, Nr. 17, S. 4909–4918
- [34] GOLDSCHNEIDER, I. ; GORDON, L. K. ; MORRIS, R. J.: Demonstration of Thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat. In: *J Exp Med* 148 (1978), Nov, Nr. 5, S. 1351–1366
- [35] GRUPPUSO, P. A. ; BIENIEKI, T. C. ; FARIS, R. A.: The relationship between differentiation and proliferation in late gestation fetal rat hepatocytes. In: *Pediatr Res* 46 (1999), Jul, Nr. 1, S. 14–19
- [36] GUETTIER, Catherine: [Which stem cells for adult liver?]. In: *Ann Pathol* 25 (2005), Feb, Nr. 1, S. 33–44
- [37] GUO, Danqing ; FU, Tao ; NELSON, Jeffery A. ; SUPERINA, Riccardo A. ; SORIANO, Humberto E.: Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retror-sine and carbon tetrachloride. In: *Transplantation* 73 (2002), Jun, Nr. 11, S. 1818–1824



- 
- [38] HAAS, R. J. ; HOELZER, D. ; KURRLE, E. ; LANDENBERGER, B. ; WINKLER, U.: Experimental analysis of developing hemopoiesis in fetal bone marrow. In: *Pediatr Res* 10 (1976), Mar, Nr. 3, S. 164–168
- [39] HAISCH, K. ; GIBBS, B. F. ; KÖRBER, H. ; ERNST, M. ; GRAGE-GRIEBENOW, E. ; SCHLAAK, M. ; HAAS, H.: Purification of morphologically and functionally intact human basophils to near homogeneity. In: *J Immunol Methods* 226 (1999), Jun, Nr. 1-2, S. 129–137
- [40] HAMAMOTO, R. ; KAMIHIRA, M. ; IJIMA, S.: Growth and differentiation of cultured fetal hepatocytes isolated various developmental stages. In: *Biosci Biotechnol Biochem* 63 (1999), Feb, Nr. 2, S. 395–401
- [41] HARUNA, Y. ; SAITO, K. ; SPAULDING, S. ; NALESNIK, M. A. ; GERBER, M. A.: Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. In: *Hepatology* 23 (1996), Mar, Nr. 3, S. 476–481
- [42] HE, Z. P. ; TAN, W. Q. ; TANG, Y. F. ; ZHANG, H. J. ; FENG, M. F.: Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. In: *Cell Prolif* 37 (2004), Apr, Nr. 2, S. 177–187
- [43] HIGASHIYAMA, Reiichi ; INAGAKI, Yutaka ; HONG, Yun Y. ; KUSHIDA, Miwa ; NAKAO, Sachie ; NIIOKA, Maki ; WATANABE, Tetsu ; OKANO, Hideyuki ; MATSUZAKI, Yumi ; SHIOTA, Goshi ; OKAZAKI, Isao: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. In: *Hepatology* 45 (2007), Jan, Nr. 1, S. 213–222
- [44] HINO, H. ; TATENO, C. ; SATO, H. ; YAMASAKI, C. ; KATAYAMA, S. ; KOHASHI, T. ; ARATANI, A. ; ASAHARA, T. ; DOHI, K. ; YOSHIZATO, K.: A long-term culture of human hepatocytes which show a high growth potential and express their differentiated phenotypes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 256 (1999), Mar, Nr. 1, S. 184–191
- [45] HUMEAU, L. ; BARDIN, F. ; MAROC, C. ; ALARIO, T. ; GALINDO, R. ; MANNONI, P. ; CHABANNON, C.: Phenotypic, molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells. In: *Blood* 87 (1996), Feb, Nr. 3, S. 949–955

- 
- [46] JANG, Yoon-Young ; COLLECTOR, Michael I. ; BAYLIN, Stephen B. ; DIEHL, Anna M. ; SHARKIS, Saul J.: Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. In: *Nat Cell Biol* 6 (2004), Jun, Nr. 6, S. 532–539
- [47] KAESTNER, Klaus H.: The making of the liver: developmental competence in foregut endoderm and induction of the hepatogenic program. In: *Cell Cycle* 4 (2005), Sep, Nr. 9, S. 1146–1148
- [48] KANG, Xin-Qin ; ZANG, Wei-Jin ; SONG, Tu-Sheng ; XU, Xiao-Li ; YU, Xiao-Jiang ; LI, Dong-Ling ; MENG, Ke-Wei ; WU, Sheng-Li ; ZHAO, Zhi-Ying: Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. In: *World J Gastroenterol* 11 (2005), Jun, Nr. 22, S. 3479–3484
- [49] KATO, K. ; RADBRUCH, A.: Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. In: *Cytometry* 14 (1993), Nr. 4, S. 384–392
- [50] KAWASAKI, Takako ; TAMURA, Shinji ; KISO, Shinichi ; DOI, Yoshinori ; YOSHIDA, Yuichi ; KAMADA, Yoshihiro ; SAEKI, Ayuko ; SAJI, Yukiko ; MATSUZAWA, Yuji: Effects of growth factors on the growth and differentiation of mouse fetal liver epithelial cells in primary cultures. In: *J Gastroenterol Hepatol* 20 (2005), Jun, Nr. 6, S. 857–864
- [51] KELLER, G. ; LACAUD, G. ; ROBERTSON, S.: Development of the hematopoietic system in the mouse. In: *Exp Hematol* 27 (1999), May, Nr. 5, S. 777–787
- [52] KOENIG, Sarah ; PROBST, Irmelin ; BECKER, Heinz ; KRAUSE, Petra: Zonal hierarchy of differentiation markers and nestin expression during oval cell mediated rat liver regeneration. In: *Histochem Cell Biol* 126 (2006), Dec, Nr. 6, S. 723–734
- [53] LANGE, C. ; BASSLER, P. ; LIOZNOV, M. V. ; BRUNS, H. ; KLUTH, D. ; ZANDER, A. R. ; FIEGEL, H. C.: Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. In: *Transplant Proc* 37 (2005), Nr. 1, S. 276–279
- [54] LANGE, Claudia ; BASSLER, Philipp ; LIOZNOV, Michael-V. ; BRUNS, Helge ; KLUTH, Dietrich ; ZANDER, Axel-R. ; FIEGEL, Henning-C.: Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. In: *World J Gastroenterol* 11 (2005), Aug, Nr. 29, S. 4497–4504

- 
- [55] LÁZARO, C. A. ; RHIM, J. A. ; YAMADA, Y. ; FAUSTO, N.: Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. In: *Cancer Res* 58 (1998), Dec, Nr. 23, S. 5514–5522
- [56] MATSUOKA, S. ; TSUJI, K. ; HISAKAWA, H. ; MJ, Xu ; EBIHARA, Y. ; ISHII, T. ; SUGIYAMA, D. ; MANABE, A. ; TANAKA, R. ; IKEDA, Y. ; ASANO, S. ; NAKAHATA, T.: Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. In: *Blood* 98 (2001), Jul, Nr. 1, S. 6–12
- [57] MEDLOCK, E. S. ; HAAR, J. L.: The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. In: *Anat Rec* 207 (1983), Sep, Nr. 1, S. 31–41
- [58] MICHALOPOULOS, G. K. ; DEFRANCES, M. C.: Liver regeneration. In: *Science* 276 (1997), Apr, Nr. 5309, S. 60–66
- [59] MILLER, Sandra C.: Hematopoietic reconstitution of irradiated, stem cell-injected mice: early dynamics of restoration of the cell lineages of the spleen and bone marrow. In: *J Hematother Stem Cell Res* 11 (2002), Dec, Nr. 6, S. 965–970
- [60] MITAKA, T.: Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2001), Feb, Nr. 1, S. 1–5
- [61] NAVA, Silvia ; WESTGREN, Magnus ; JAKSCH, Marie ; TIBELL, Annika ; BROOMÉ, Ulrika ; ERICZON, Bo-Göran ; SUMITRAN-HOLGERSSON, Suchitra: Characterization of cells in the developing human liver. In: *Differentiation* 73 (2005), Jun, Nr. 5, S. 249–260
- [62] NIERHOFF, Dirk ; OGAWA, Atsushi ; OERTEL, Michael ; CHEN, Yuan-Qing ; SHAFRITZ, David A.: Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity. In: *Hepatology* 42 (2005), Jul, Nr. 1, S. 130–139
- [63] NITOU, Miho ; SUGIYAMA, Yoshinori ; ISHIKAWA, Katsutoshi ; SHIOJIRI, Nobuyoshi: Purification of fetal mouse hepatoblasts by magnetic beads coated with monoclonal anti-e-cadherin antibodies and their in vitro culture. In: *Exp Cell Res* 279 (2002), Oct, Nr. 2, S. 330–343
- [64] OMORI, N. ; OMORI, M. ; EVARTS, R. P. ; TERAMOTO, T. ; MILLER, M. J. ; HOANG, T. N. ; THORGEIRSSON, S. S.: Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during

- stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. In: *Hepatology* 26 (1997), Sep, Nr. 3, S. 720–727
- [65] OVERTURF, K. ; DHALIMY, M. al ; OU, C. N. ; FINEGOLD, M. ; GROMPE, M.: Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. In: *Am J Pathol* 151 (1997), Nov, Nr. 5, S. 1273–1280
- [66] PETERSEN, B. E. ; BOWEN, W. C. ; PATRENE, K. D. ; MARS, W. M. ; SULLIVAN, A. K. ; MURASE, N. ; BOGGS, S. S. ; GREENBERGER, J. S. ; GOFF, J. P.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. In: *Science* 284 (1999), May, Nr. 5417, S. 1168–1170
- [67] PETERSEN, B. E. ; GOFF, J. P. ; GREENBERGER, J. S. ; MICHALOPOULOS, G. K.: Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. In: *Hepatology* 27 (1998), Feb, Nr. 2, S. 433–445
- [68] PETERSEN, B. E. ; ZAJAC, V. F. ; MICHALOPOULOS, G. K.: Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. In: *Hepatology* 27 (1998), Apr, Nr. 4, S. 1030–1038
- [69] PETKOV, P. M. ; KIM, K. ; SANDHU, J. ; SHAFRITZ, D. A. ; DABEVA, M. D.: Identification of differentially expressed genes in epithelial stem/progenitor cells of fetal rat liver. In: *Genomics* 68 (2000), Sep, Nr. 2, S. 197–209
- [70] RHIM, J. A. ; SANDGREN, E. P. ; DEGEN, J. L. ; PALMITER, R. D. ; BRINSTER, R. L.: Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. In: *Science* 263 (1994), Feb, Nr. 5150, S. 1149–1152
- [71] ROGLER, L. E.: Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro. In: *Am J Pathol* 150 (1997), Feb, Nr. 2, S. 591–602
- [72] SCHMELZER, Eva ; WAUTHIER, Eliane ; REID, Lola M.: The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. In: *Stem Cells* 24 (2006), Aug, Nr. 8, S. 1852–1858
- [73] SELL, S.: Is there a liver stem cell? In: *Cancer Res* 50 (1990), Jul, Nr. 13, S. 3811–3815
- [74] SELL, S.: Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. In: *Hepatology* 33 (2001), Mar, Nr. 3, S. 738–750

- 
- [75] SHIOJIRI, N. ; INUJIMA, S. ; ISHIKAWA, K. ; TERADA, K. ; MORI, M.: Cell lineage analysis during liver development using the spf(ash)-heterozygous mouse. In: *Lab Invest* 81 (2001), Jan, Nr. 1, S. 17–25
- [76] SHIOJIRI, N. ; LEMIRE, J. M. ; FAUSTO, N.: Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. In: *Cancer Res* 51 (1991), May, Nr. 10, S. 2611–2620
- [77] SIGAL, S. H. ; BRILL, S. ; REID, L. M. ; ZVIBEL, I. ; GUPTA, S. ; HIXSON, D. ; FARIS, R. ; HOLST, P. A.: Characterization and enrichment of fetal rat hepatoblasts by immunoadsorption ("panning") and fluorescence-activated cell sorting. In: *Hepatology* 19 (1994), Apr, Nr. 4, S. 999–1006
- [78] SÁNCHEZ, A. ; ALVAREZ, A. M. ; PAGAN, R. ; RONCERO, C. ; VILARÓ, S. ; BENITO, M. ; FABREGAT, I.: Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. In: *J Hepatol* 32 (2000), Feb, Nr. 2, S. 242–250
- [79] STRAIN, A. J. ; CROSBY, H. A.: Hepatic stem cells. In: *Gut* 46 (2000), Jun, Nr. 6, S. 743–745
- [80] TANIMIZU, Naoki ; SAITO, Hiroki ; MOSTOV, Keith ; MIYAJIMA, Atsushi: Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk+ hepatoblasts. In: *J Cell Sci* 117 (2004), Dec, Nr. Pt 26, S. 6425–6434
- [81] TATEMATSU, M. ; HO, R. H. ; KAKU, T. ; EKEM, J. K. ; FARBER, E.: Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. In: *Am J Pathol* 114 (1984), Mar, Nr. 3, S. 418–430
- [82] TAVIAN, M. ; HALLAIS, M. F. ; PÉAULT, B.: Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. In: *Development* 126 (1999), Feb, Nr. 4, S. 793–803
- [83] TAVIAN, M. ; ROBIN, C. ; COULOMBEL, L. ; PÉAULT, B.: The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. In: *Immunity* 15 (2001), Sep, Nr. 3, S. 487–495
- [84] THEISE, N. D. ; BADVE, S. ; SAXENA, R. ; HENEGARIU, O. ; SELL, S. ; CRAWFORD, J. M. ; KRAUSE, D. S.: Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. In: *Hepatology* 31 (2000), Jan, Nr. 1, S. 235–240

- 
- [85] THORGEIRSSON, S. S.: Hepatic stem cells in liver regeneration. In: *FASEB J* 10 (1996), Sep, Nr. 11, S. 1249–1256
- [86] THORGEIRSSON, S. S. ; EVARTS, R. P. ; BISGAARD, H. C. ; FUJIO, K. ; HU, Z.: Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 204 (1993), Dec, Nr. 3, S. 253–260
- [87] THORGEIRSSON, Snorri S. ; GRISHAM, Joe W.: Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. In: *Hepatology* 43 (2006), Jan, Nr. 1, S. 2–8
- [88] VESSEY, C. J. ; HALL, P. M. I.: Hepatic stem cells: a review. In: *Pathology* 33 (2001), May, Nr. 2, S. 130–141
- [89] VICKREY, H. M. ; JOSEPH, R. R. ; MCCANN, D. S.: Continuous culture of normal adult mammalian hepatocytes exhibiting parenchymal functions. In: *In Vitro* 15 (1979), Feb, Nr. 2, S. 120–127
- [90] WEBER, Anne ; MAHIEU-CAPUTO, Dominique ; HADCHOUEL, Michelle ; FRANCO, Dominique: Hepatocyte transplantation: studies in preclinical models. In: *J Inherit Metab Dis* 29 (2006), Nr. 2-3, S. 436–441
- [91] WILLIAMS, A. F.: Many cells in rat bone marrow have cell-surface Thy-1 antigen. In: *Eur J Immunol* 6 (1976), Jul, Nr. 7, S. 526–528
- [92] WILLIAMS, A. F.: The structure of Thy-1 antigen. In: *Immunol Ser* 45 (1989), S. 49–69
- [93] WILSON, J. W. ; GROAT, C. S. ; LEDUC, E. H.: HISTOGENESIS OF THE LIVER. In: *Ann N Y Acad Sci* 111 (1963), Dec, S. 8–24
- [94] WILSON, J. W. ; LEDUC, E. H.: Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. In: *J Pathol Bacteriol* 76 (1958), Oct, Nr. 2, S. 441–449
- [95] YAMAMOTO, Y. ; YASUMIZU, R. ; AMOU, Y. ; WATANABE, N. ; NISHIO, N. ; TOKI, J. ; FUKUHARA, S. ; IKEHARA, S.: Characterization of peripheral blood stem cells in mice. In: *Blood* 88 (1996), Jul, Nr. 2, S. 445–454
- [96] YIN, L. ; LYNCH, D. ; ILIC, Z. ; SELL, S.: Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl<sub>4</sub>/2-AAF injury. In: *Histol Histopathol* 17 (2002), Jan, Nr. 1, S. 65–81

- 
- [97] ZHAO, Roong ; DUNCAN, Stephen A.: Embryonic development of the liver. In: *Hepatology* 41 (2005), May, Nr. 5, S. 956–967
- [98] ZHENG, Y. W. ; TANIGUCHI, H. ; SUZUKI, A. ; TAKADA, Y. ; FUKUNAGA, K. ; SEINO, K. ; YUZAWA, K. ; OTSUKA, M. ; FUKAO, K. ; NAKAUCHI, H.: Effects of combined growth factors on clonal growth and albumin secretion of murine fetal hepatocytes in low density culture. In: *Transplant Proc* 32 (2000), Nov, Nr. 7, S. 2372–2373
- [99] ZHENG, Y. W. ; TANIGUCHI, H. ; SUZUKI, A. ; TAKADA, Y. ; FUKUNAGA, K. ; SEINO, K. ; YUZAWA, K. ; OTSUKA, M. ; FUKAO, K. ; NAKAUCHI, H.: Effects of four extracellular matrices associated with growth factors on clonal culture and proliferation of murine fetal hepatocytes. In: *Transplant Proc* 32 (2000), Nov, Nr. 7, S. 2498–2499
- [100] ZHOU, Qing-Jun ; XIANG, Li-Xin ; SHAO, Jian-Zhong ; HU, Ruo-Zhen ; LU, Yong-Liang ; YAO, Hang ; DAI, Li-Cheng: In vitro differentiation of hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells induced by sodium butyrate. In: *J Cell Biochem* 100 (2007), Jan, Nr. 1, S. 29–42
- [101] ZHU, Ying ; LIU, Ping ; WANG, Lei ; LU, Xiong: [The dynamic expression of Thy1.1 positive hepatic oval cells during the shaping and reducing processes of liver cirrhosis induced by dimethylnitrosamine in rats]. In: *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 13 (2005), Nov, Nr. 11, S. 823–827

## **Danksagung**

Abschliessend möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Dietrich Kluth für die Möglichkeit der Promotion und die Überantwortung des Themas bedanken.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. med. Henning C. Fiegel, der als Betreuer dieser Arbeit nicht nur fachlich versiert war.

Im Labor danke ich ganz besonders Frau Beate Roth, aber auch den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe: Frau Christina Höper, Frau Jana Ahrend und Herrn Daniel Schultze.

Frau Svyetlana Lovric danke ich für anhaltende Unterstützung und Motivation.

Und wem hätte ich mehr zu danken als meinen Eltern!



## Curriculum vitae

### **Persönliche Daten:**

Vor- und Zuname:	Helge Bruns
Geburtsdatum:	15.10.1976
Geburtsort:	Elmshorn
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig
Studien- und Meldeadresse:	Rutschbahn 23, 20146 Hamburg

### **Ausbildung:**

#### **Schulische Ausbildung:**

Besuch der Grundschule (Uetersen) 1983 - 1987

Besuch des Gymnasiums (Uetersen und Hamburg) 1987 - 1997 mit Abschluss  
Abitur.

#### **Universitäre Ausbildung:**

Beginn des Studiums der Informatik an der Universität Hamburg zum Wintersemester 1998.

Beginn des Studiums der Humanmedizin zum Wintersemester 2000 an dem Universitätskrankenhaus Eppendorf/Hamburg

Physikum und Eintritt in die Klinik im August 2002.

1. Staatsexamen im August 2003.

2. Staatsexamen im August 2005.

Praktisches Jahr vom 24.10.2005 bis zum 23.09.2006.

3. Staatsexamen und Abschluss des Studiums im November 2006.

#### **Tätigkeiten:**

Zivildienst im Berufsförderungswerk Hamburg vom 03.11.1997 - 30.11.1998.

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

gez. Helge Bruns