

**Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktorin (komm.): Dr. med. Katharina Wenke,
Altonaer Kinderkrankenhaus**

**Fetale Leberstammzellen der Ratte:
Expansion von Zelllinien in vitro**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Jana Isabel Ahrend
geboren in Hamburg**

Hamburg, 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1 Abstrakt

1	Abstrakt	1
---	----------	---

2 Einleitung

2.1	Die Leber	2
2.2	Die Embryogenese der Leber	3
2.3	Zelltypen der adulten Leber	4
2.4	Zelltypen der fetalen Leber	5
2.5	Ziele dieser Arbeit	7

3 Material und Methoden

3.1	Versuchsaufbau	8
3.1.1	Versuchsdesign	8
3.1.2	Zellarten und Kulturbedingungen	10
3.2	Materialien und Bezugsquellen	10
3.2.1	Antikörper zur Elimination der hämatopoetischen Zellen mittels MACS	10
3.2.2	Antikörper zur Trennung Thy-1-positiver und Thy-1-negativer Zellen mittels MACS	10
3.2.3	Antikörper der immunhistochemischen Auswertung	10
3.2.4	Chemikalien	11
3.2.5	Technische Geräte	12
3.2.6	Verbrauchsmaterial und Glaswaren	13
3.3	Allgemeine Arbeitsmethoden	13
3.3.1	Sterilisierung der Arbeitsmaterialien	13
3.3.2	Zellzentrifugation	13
3.3.3	Trypan-Blau-Zellzählung	15

3 Material und Methoden (*Fortsetzung*)

3.3.4	EDV und statistische Analyse	16
3.4	Tiere	16
3.5	Isolutionslösungen	16
3.6	Kulturmedien	17
3.6.1	Kulturmedium der fetalen Hepatozyten	17
3.6.2	Kulturmedium der fetalen Stammzellen	18
3.7	Kollagenbeschichtung der Kulturplatten	18
3.8	Zellisolation	19
3.8.1	Isolation der fetalen Leberzellen	19
3.8.2	Elimination hämatopoetischer Zellen mittels MACS	20
3.8.3	Isolation Thy-1-positiver und Thy-1-negativer Zellen mittels MACS	21
3.8.4	Isolutionszahlen	22
3.9	Zellkultur	23
3.10	Zellzählung und Datenanalyse	23
3.11	Polymerase Ketten Reaktion zur Bestimmung der Markerexpression	24
3.11.1	RNA-Isolation	24
3.11.2	c-DNA-Synthese	25
3.11.3	Polymerase Ketten Reaktion	26
3.11.4	Gel-Elektrophorese	28
3.12	Passage der Zellkultur	28
3.13	Cytospins, Objektträgerkulturen und Immunzytochemie zur Bestimmung der Markerexpression	29
3.13.1	Anfertigung von Cytospins und Objektträgerkulturen	29
3.13.2	Immunzytochemie	29

4 Ergebnisse

4.1	Absolutes Zellwachstum in Kultur	30
4.1.1	Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in absoluten Zellzahlen	31

4 Ergebnisse (*Fortsetzung*)

4.1.2	Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM in absoluten Zellzahlen	34
4.1.3	Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in absoluten Zellzahlen	37
4.1.4	Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM in absoluten Zellzahlen	40
4.2	Prozentuales Zellwachstum in Kultur	43
4.2.1	Prozentuales Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	43
4.2.2	Prozentuales Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	46
4.3	Zellwachstum unter Einfluss des Kulturmediums	48
4.4	Zellwachstum unter Einfluss des Gestationsalters	51
4.5	RT-PCR Analyse der Thy-1-positiven Zellen in Kultur	54
4.5.1	RT-PCR Analyse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen	54
4.5.2	RT-PCR Analyse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen	55
4.6	RT-PCR Analyse der Thy-1-negativen Zellen in Kultur	56
4.6.1	RT-PCR Analyse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen	56
4.6.2	RT-PCR Analyse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen	57
4.7	Auswertung der RT-PCR Analyse in tabellarischer Form	58
4.7.1	RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	58

4 Ergebnisse (Fortsetzung)

4.7.2	RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	59
4.7.3	RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	59
4.7.4	RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	60
4.7.5	RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen	60
4.7.6	RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen	61
4.7.7	RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen	61
4.7.8	RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen	62
4.7.9	RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	62
4.7.10	RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	63
4.7.11	RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	63
4.7.12	RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	64
4.8	Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen	64
4.9	Differenzierung unter Einfluss des Kulturmediums	67
4.10	Differenzierung unter Einfluss des Gestationsalters	68
4.11	Immunzytochemische Analyse	73

5 Diskussion

5.1	Wachstum der Zellen in Kultur	75
5.1.1	Wachstum der unterschiedlichen Zelltypen	75

5 Diskussion (*Fortsetzung*)

5.1.2	Wachstum unter Einfluss des Kulturmediums	76
5.1.3	Wachstum unter Einfluss des Gestationsalters	78
5.2.	Differenzierung der Zellen in Kultur	79
5.2.1	Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen	79
5.2.2	Differenzierung unter Einfluss des Kulturmediums	80
5.2.3	Differenzierung unter Einfluss des Gestationsalters	80

6 Zusammenfassung

6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	80
-----	--------------------------------	----

7 Fazit der Arbeit

7.1	Beurteilung der Ergebnisse	81
7.2	Darstellung möglicher Fehlerquellen	85
7.3	Beantwortung der fünf Leitfragen	86
7.4	Ausblick	87

8 Verzeichnisse

8.1	Abbildungsverzeichnis	89
8.2	Abkürzungsverzeichnis	94
8.3	Literaturverzeichnis	96

9	Danksagung	101
----------	-------------------	-----

10	Curriculum vitae	102
-----------	-------------------------	-----

11	Erklärung	103
-----------	------------------	-----

1 Abstrakt

Stammzellen der Leber bieten erfolgsversprechende Aussichten für die Therapie von Lebererkrankungen. In der adulten Leber wurden bereits hepatische Stammzellen nachgewiesen und charakterisiert. Während der fetalen Periode der Leberentwicklung galt der Hepatoblast lange Zeit als einziger Progenitor. In vorausgegangenen Arbeiten konnten jedoch auch schon während der Entwicklungsphase der Leber verschiedene Zelltypen nachgewiesen werden. Dabei wurden potentielle Stammzellen der fetalen Rattenleber identifiziert und ein Isolationsverfahren zur Gewinnung dieser Zellen etabliert. Diese Zellen weisen mit der Expression des Stammzellmarkers Thy-1 und des Leberzellmarkers CK-18 ein typisches Markerprofil von Stammzellen auf und grenzen sich damit von anderen Leberzellen, die nur CK-18-positiv sind, ab. In Zellkulturen kann die Differenzierungsmöglichkeit dieser Zellen in Richtung Leberzelle aufgezeigt werden. Auch weisen die Zellen ein stammzellartiges Wachstumspotential auf.

Ziel dieser Arbeit ist es, aus den potentiellen Stammzellen der fetalen Rattenleber Zelllinien zu generieren und Wachstums- und Differenzierungspotentiale dieser Zellen nach Passagierung in vitro zu evaluieren. Dazu werden an den Schwangerschaftstagen 16 und 20 isolierte fetale Leberzellen der Ratte unter Verwendung des Magnetic Cell Sorting (MACS) von OX 43- und OX 44-positiven hämatopoetischen Zellen gereinigt und in Thy-1-positive und Thy-1-negative Zellen unterteilt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt unter Verwendung zweier Medien - dem Fetalen Hepatozyten Medium FHM und dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Im Allgemeinen zeigen die Thy-1-negativen Zellen verglichen mit den Thy-1-positiven Zellen ein signifikant stärkeres Zellwachstum. Die Zellen weisen initial unter Kultivierung mit Stem Span und nach der ersten Passage unter FHM-Kultivierung ein stärkeres Wachstumspotential auf. Die Thy-1-positiven Zellen zeigen ein stärkeres Zellwachstum bei Isolation an ED 20, die Thy-1-negativen bei Isolation an ED 16. Bezüglich der Zelldifferenzierung in Richtung leberspezifische Zellpopulation zeigen die Thy-1-negativen verglichen mit den Thy-1-positiven Zellen, die an ED 16 isolierten Zellen gegenüber denen von ED 20 und die mit Stem Span kultivierten Zellen im Vergleich mit der FHM-Zellpopulation generell einen Differenzierungsvorteil. Die Expression der leberspezifischen Marker CK-18, Albumin und Alpha-Feto-Protein kann sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Diese Daten lassen vermuten, dass das Generieren von Zelllinien einer potentiellen fetalen Leberstammzelle unter Beibehaltung ihres hepatischen Differenzierungspotentials möglich ist.

2 Einleitung

2.1 Die Leber

Die Leber erfüllt zentrale Aufgaben im Stoffwechselsystem des Menschen. Die meisten Funktionen werden dabei von den Leberzellen, den Hepatozyten, übernommen. Neben verschiedenen Syntheseleistungen erfüllt die Leber Aufgaben in Verwertungs- und Speicherungsprozessen und beteiligt sich maßgeblich an Abbau und Entgiftung von Abfallprodukten. Die mit der Nahrung aufgenommenen Eiweiße werden in der Leber in körpereigene Proteine umgewandelt, die dann der

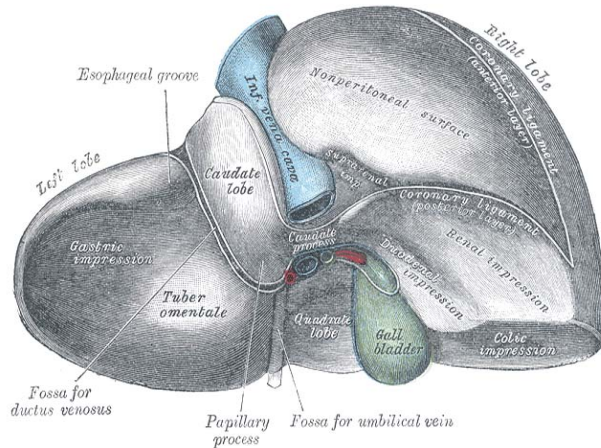


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der posterioren Oberfläche der Leber.
Quelle: Reproduktion einer Lithographie aus "Gray's Anatomy" (1918, Fig. 1087),
<<http://www.bartleby.com/107/illus1087.html>>, Abruf vom 17.06.2007, 13h.

Produktion von Hormonen und Enzymen dienen. Auch die Bildung von Gerinnungsfaktoren, Antithrombin, Protein-S und Protein-C benötigt die Proteine als Synthesebausteine. Die über den Darm resorbierten Kohlehydrate gelangen über die Pfortader in die Leber und werden dort in den für die Energiegewinnung verwertbaren Baustein Glukose umgewandelt oder in die Speicherform Glykogen überführt. Auch die Neubildung von Zucker, die Glukoneogenese, z.B. aus Lactat/Pyruvat, gehört zu den Leistungen der Leber. Die in der Leber stattfindende Verarbeitung der aufgenommenen Fette zu körpereigenen Substanzen ist erforderlich, da nur diese vom Körper gespeichert und im Bedarfsfall zur Energiegewinnung genutzt werden können. Den im so genannten Dissé-Raum, dem Spaltraum zwischen Leberkapillaren und Hepatozyten, befindlichen Vitamin A reichen Ito-Zellen kommt dabei eine tragende Rolle zu. Auch die Speicherung von Vitaminen und Eisen ist eine organspezifische Leistung der Leber. Die Elimination von Fremdstoffen im Blut wird von speziellen Makrophagen geleistet, den Kupffer'schen Sternzellen, die sich entlang der Leberkapillare, der Lebersinusoide, anordnen. Bakterien oder geschädigte rote Blutzellen werden beispielsweise von ihnen aus dem Blut entfernt. Auch immunologisch ist die Leber von Bedeutung, da immunaktive Zellen Antigene aus dem Blut der Pfortader eliminieren. Toxische

Abbauprodukte der Stoffwechselfvorgänge werden von der Leber neutralisiert und so der Ausscheidung zugänglich gemacht. Im Falle des beim Eiweißabbau entstehenden Ammoniaks erfolgt die Ausscheidung nach der Umwandlung in Harnstoff über die Niere. Andere Abbauprodukte, wie etwa das Abbauprodukt des Hämoglobins, das Bilirubin, sowie Toxine und andere chemische Substanzen werden überwiegend mit der Galle über den Darm ausgeschieden. Die Bildung der Gallensäuren aus synthetisiertem Cholesterol stellt eine weitere Syntheseleistung der Leber dar und ermöglicht den Verdauungsprozess von Nährstoffen im Darm.

In der fetalen Periode, bis etwa zum siebten Schwangerschaftsmonat, übernimmt die Leber überdies Funktionen in der Hämatopoese. Die so genannte hepato-lienale Phase der Hämatopoese wird im Verlauf von der myeloischen Hämatopoese abgelöst.

Die Leber besitzt die Fähigkeit zur Regeneration. Diese Tatsache wird beispielsweise im Bereich der Lebertransplantation genutzt. Im Rahmen einer Lebendspende reichen bereits 20 % einer adulten Spenderleber als Spende für ein Kind aus. Erwachsene erhalten 60 % der Spenderleber. Dank der enormen Regenerationsfähigkeit der Leberzellen weisen sowohl Spender als auch Empfänger schon nach kurzer Zeit ein zu 100 % wiederhergestelltes Lebervolumen auf.

2.2 Die Embryogenese der Leber

Endodermale Zellen wachsen aus dem embryonalen Vorderdarm in das mesenchymale Septum transversum ein und beginnen so die Organogenese der Leber [1]. Als einziger Progenitor der fetalen Leberentwicklung auf zellulärer Ebene galt dabei lange Zeit der Hepatoblast [2]. Er besitzt eine bipotente Differenzierungsfähigkeit und reift entweder zum Hepatozyt oder zur Gallengangsepithelzelle aus [2, 3]. Diese Eigenschaft der Hepatoblasten zeigt die Ähnlichkeit mit den adulten hepatischen Stammzellen, den Oval Cells, auf.



Abbildung 2.2: Embryo der 7. Schwangerschaftswoche. Die mit dem Stern markierte Struktur stellt die Leberanlage dar.

Quelle: Photographie von Ed Uthman, MD, American Board of Pathology, <http://web2.airmail.net/uthman/specimens/images/tubal_embryo.html>, Abruf vom 17.06.2007, 14h.

2.3 Zelltypen der adulten Leber

In der adulten Leber ist eine Hierarchie der unterschiedlichen Zellkompartimente weitgehend charakterisiert [4]. Die Leberzelltypen können anhand ihrer spezifischen phenotypischen Markerexpression identifiziert werden [3-8].

Das erste Zellkompartiment bilden dabei die hepatischen Stammzellen, die Oval Cells [6]. Es handelt sich um in den Hering-Kanälen ruhende Stammzellen, die eine Koexpression von hämatopoetischen Stammzellmarkern, wie CD 34, Thy-1 und c-kit [9, 10] und hepatischen Markern, wie Cytoceratin-18, Albumin und Alpha-Feto-Protein zeigen [5, 8, 11-14]. Die Oval Cells weisen mit ihren bipotenten Differenzierungsmöglichkeiten in Richtung Hepatozyt oder in Richtung Gallengangsepithelzelle [15], ihren hohen proliferativen Fähigkeiten und ihrem klonalen Wachstumspotential in vivo [16] und in vitro [17] für Stammzellen charakteristische Eigenschaften auf. In neueren Studien konnte der Ursprung der Oval Cells von extrahepatischen Stammzellen des Knochenmarks aufgezeigt werden [18-20]. Tierversuche an Nagetieren lassen vermuten, dass c-kit-positive Knochenmarkstammzellen zu hepatischen Zellen differenzieren können. Auch am Menschen konnten in vorausgegangenen Arbeiten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. In Gewebeproben von Patienten, die eine Knochenmarkstransplantation vom anderen Geschlecht erhalten hatten, fanden sich sowohl Leberstammzellen als auch reife Hepatozyten aus dem Spenderknochenmark [21, 22]. Knochenmarkstammzellen zeigten in anderen Versuchen ein weitgehendes Differenzierungspotential. So wurden in Empfängern von peripheren Blutstammzellen neben Leberzellen [23] auch pulmonale, gastrointestinale und dermale Zellen der Spender nachgewiesen [24, 25]. Die Differenzierung zu hepatischen Zellen kann in vitro, z.B. durch Gabe von hoch dosiertem Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), induziert werden [26]. Zwei Mechanismen für die Entstehung der Oval Cells in der adulten Leber sind denkbar: Zum einen könnten Knochenmarkzellen unter pathologischen Bedingungen in die Leber einwandern, zum anderen könnten inaktive fetale Leberstammzellen in der geschädigten Leber reaktiviert werden [27, 28].

Ein zweites Zellkompartiment der adulten Leber wird von kleinen Hepatozyten, den "small hepatocytes", gebildet [29]. Diese Zellen formen in vitro Zellkolonien und exprimieren sowohl hepatische als auch biliäre Marker [30, 31].

Ein weiteres Zellkompartiment besteht aus parenchymatösen Hepatozyten, welche ebenfalls ein enormes proliferatives Potential aufweisen.

Die Hierarchie dieser Zellkompartimente wird auch in der Leberregeneration ersichtlich [4]. Die Oval Cells sind in die "einfache" Leberregeneration nicht involviert. Die parenchymatösen Hepatozyten weisen im Rahmen serieller Transplantationen ein enormes Proliferationspotential auf und zeigen sich in der Lage die meisten Leberschädigungen, wie beispielsweise nach einer partiellen Hepatektomie, eigenständig beheben zu können ("unicommitted-stem-cell-Konzept") [32-34]. Die Oval Cells werden nur unter bestimmten Bedingungen, z.B. nach umfangreicher Leberschädigung oder nach Zellaktivierung mittels spezifischer Modelle der Leberzerstörung, aktiviert [6, 13, 35]. Unter solchen Bedingungen können die parenchymatösen Hepatozyten den Defekt nicht vollständig kompensieren [5]. Im Versuchsmodell der zentrolobulären Schädigung mittels Carbon-Tetrachlorid CCl₄ bei Unterdrückung der Hepatozytenproliferation durch Behandlung der Leberzellen mit N-2-Acetylaminofluor AAF-2 zeigt sich die Aktivierung duktaler Leberzellschädigungsvorläuferzellen, aus denen sowohl Hepatozyten als auch Gallengangsepithelzellen hervorgehen [4, 11, 35]. Bei der durch Allylalkohol hervorgerufenen periportalen Schädigung werden periduktale Oval Cells im Prozess der Regeneration aktiviert [4, 6, 35, 36]. Auch bei chronischer Schädigung der humanen Leber übernehmen die Oval Cells die Aufgabe der Regeneration [10]. Die kleinen Hepatozyten treten bei definiertem Leberzellschaden in die Phase der Regeneration ein. In Tierversuchen konnte die Aktivierung dieser Zellen nach Gabe von Pyrrolizidine Alkaloid Retrorsine und partieller Hepatektomie nachgewiesen werden [37, 38].

2.4 Zelltypen der fetalen Leber

Auch schon während der fetalen Leberentwicklung konnten verschieden Zelltypen identifiziert werden [39-41]. Mittels Magnetic Cell Sorting, MACS, ist es möglich, hämatopoetische und hepatische Zellen voneinander zu trennen. Die Zusammenhänge der Genexpression des Stammzellmarkers Thy-1 und des Leberzellmarkers CK-18 wurden in früheren Studien anhand der separierten hepatischen Zellen im Verlauf der fetalen Leberentwicklung verfolgt. So wurden in fetalen Leberzellisolaten der Ratte zwei verschiedene Zelllinien mit unterschiedlicher Markerexpression gefunden: fetale Leberzellen, die in ihrer Markerexpression (CK-18+, Thy-1-) den Hepatoblasten gleichen und hepatische Zellen, die sowohl CK-18 als auch Thy-1 exprimieren und damit der phänotypischen Markerexpression von adulten Leberstammzellen entsprechen [39].

Die Thy-1-positiven Zellen zeigen im Verlauf der späten fetalen Leberentwicklung eine Hochregulation der Expression des Markers AFP und eine Abnahme der Albuminexpression. Die Thy-1-negativen hepatischen Zellen verhalten sich gegenläufig [40]. Die Thy-1-negativen Zellen zeigen somit eine Reifung zu Hepatozyten, während die Thy-1-positiven Zellen zum Ende der Fetalperiode dedifferenzieren [40, 42]. Bei den Thy-1-positiven Zellen wurde ein stammzellähnliches Wachstum gezeigt.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine zelluläre Hierarchie der unterschiedlichen Zellkompartimente auch schon in der fetalen Leber existiert. Möglicherweise stellen die Thy-1-positiven Zellen das fetale Äquivalent der adulten Oval Cells dar, während die Thy-1-negativen Zellen als fetale Progenitoren der Hepatozyten anzusehen sind.

Auch in anderen Studien wurden hepatische Progenitoren der fetalen Leberentwicklung identifiziert. In der fetalen Leber der Maus wurden Leberprogenitoren erkannt und mittels Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS, isoliert. Die Zellen zeigen mit ihrem klonogenen Potential *in vitro* und ihren bipotenten Differenzierungsmöglichkeiten zu hepatischen oder Gallengangsepithelzellen typische Eigenschaften von Leberstammzellen. Die phänotypische Markerexpression (c-kit-, CD 49f+, CD 29+, CD 45- und Ter 119-) charakterisiert diese Zellen eher als undeterminierte Stammzellen, da hepatozelluläre Marker nicht nachgewiesen wurden [43-45].

In der fetalen Rattenleber wurden Fetale Leber Epithel Progenitor Zellen (FLEC) identifiziert [46, 47]. Auch diese Zellen zeigen nach Transplantation in adulte Rattenlebern ein multipotentes Differenzierungsverhalten und eine starke Proliferationskapazität. An Hand der Markerexpression dieser Zellen können sie in drei Untergruppen eingeteilt werden. Eine Zellgruppe exprimiert die Marker der unreifen Leberzelle CK-19, Albumin und AFP. Eine zweite Untergruppe der FLEC zeigt eine positive Markerexpression nur für CK-19, die dritte Gruppe exprimiert ausschließlich AFP und Albumin. Die Expression von Stammzellmarkern in diesen Zellpopulationen ist bislang unerforscht geblieben [46].

Fetale Leber Epithel Zellen, FLEC, konnten darüber hinaus auch in fetalem Lebergewebe der Maus identifiziert werden. Es ist gelungen ihr enormes Proliferationspotential sowie die Fähigkeit zur Repopularisierung ganzer Lebersegmente im Rahmen von Transplantationsversuchen darzustellen [48].

In neueren Arbeiten konnten auch hepatische Progenitoren der humanen fetalen Leberentwicklung identifiziert werden. So wurden in der humanen fetalen Leber Zellen gefunden, die in ihrer Markerexpression (CD 117+/CD 34+) der charakteristischen Markerexpression der hepatischen stammzellähnlichen Progenitoren der adulten Leber entsprechen [49]. Andere Studien haben die Expression des Oval Cell Markers Thy-1 potentieller hepatischer Progenitoren der humanen fetalen Leber gezeigt [50].

Neben den hepatischen Zellen der fetalen Leber wurden auch die hämatopoetischen Zellen genauer untersucht. Dabei zeigte sich ihr Ursprung aus dem Bereich der dorsalen periaortalen Splanchnopleura [51, 52]. Außer der gemeinsamen Lokalisation der hämatopoetischen Zellen und der Oval Cells in der Leber deutet auch ihr ähnliches Markerprofil auf eine Verwandtschaft beider Zelllinien hin. Diese konnte jedoch bislang nicht ausreichend erforscht werden.

2.5 Ziele dieser Arbeit

Es ist das Ziel dieser Arbeit, die Eigenschaften der beiden oben genannten Zelltypen der fetalen Leberentwicklung der Ratte genauer zu charakterisieren. Zu diesem Zweck soll das Wachstums- und Differenzierungspotential dieser Zellen unter Zellpassagierung in vitro analysiert und das Generieren von Zelllinien erprobt werden. Folgende Fragen sollen nach Möglichkeit beantwortet werden:

1. Welche Unterschiede weisen die Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellen bezüglich ihres Wachstumsverhaltens auf?
2. Welche Unterschiede zeigen die Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellen in Bezug auf ihre Differenzierung?
3. Welchen Einfluss hat die Auswahl des Mediums auf Wachstumskinetik und Differenzierung?
4. Welchen Einfluss hat der Gestationstag auf Wachstumskinetik und Differenzierung?
5. Ist es möglich aus den einzelnen Zellpopulationen mittels Zellpassagierung Zelllinien zu generieren?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Versuchsdesign

An zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft werden die Feten schwangerer Ratten entnommen und aus ihnen die fetalen Hepatozyten isoliert. In diesem Versuch erfolgen die Zellisolationen an den Schwangerschaftstagen 16 und 20 (siehe Abbildung 3.1). Die so gewonnenen Zellen werden mittels Magnetic Cell Sorting (MACS) von den Zellen des hämatopoetischen Systems befreit und in Thy-1-positive und Thy-1-negative hepatische Zellen aufgeteilt.

Die einzelnen Zellpopulationen werden unter Verwendung je zweier Medien auf Kollagen Typ I beschichtete 48-Well-Platten ausgesiedelt. Als Medien dienen dabei das Fetale Hepatozyten Medium FHM und das Stammzellmedium Stem Span SFEM. Ein Wechsel der Medien erfolgt an jedem zweiten Tag.

An jedem 1., 3., 5., 7. und 9. Kulturtag nach initialer Aussiedelung bzw. nach Passage erfolgt eine standardisierte Zellzählung mittels Rasterokular zur Ermittlung einer Wachstumskinetik der verschiedenen Zelltypen.

An jedem dritten Tag nach der initialen Aussiedelung bzw. nach Passage erfolgt die Isolation der Zell-RNA. Die RNA wird folgend in c-DNA transkribiert und mittels Reverser Transcriptions-PCR charakterisiert. Es wird die Expression der Marker AFP, Albumin, CK-18, GAPDH und Thy-1 überprüft.

An jedem zehnten Tag werden die Zellen passagiert, indem sie von ihrem Untergrund gelöst und in ihrer Ursprungsdichte erneut ausgesiedelt werden.

Jeweils am selben Tag wird ein Teil der Zellen zum Zweck der immuncytochemischen Zellanalyse auf Objektträgerkulturen ausgesiedelt oder direkt zur Anfertigung von Cytospins verwendet. Die Objektträgerkulturen werden am dritten Tag nach Anfertigung beendet und fixiert.

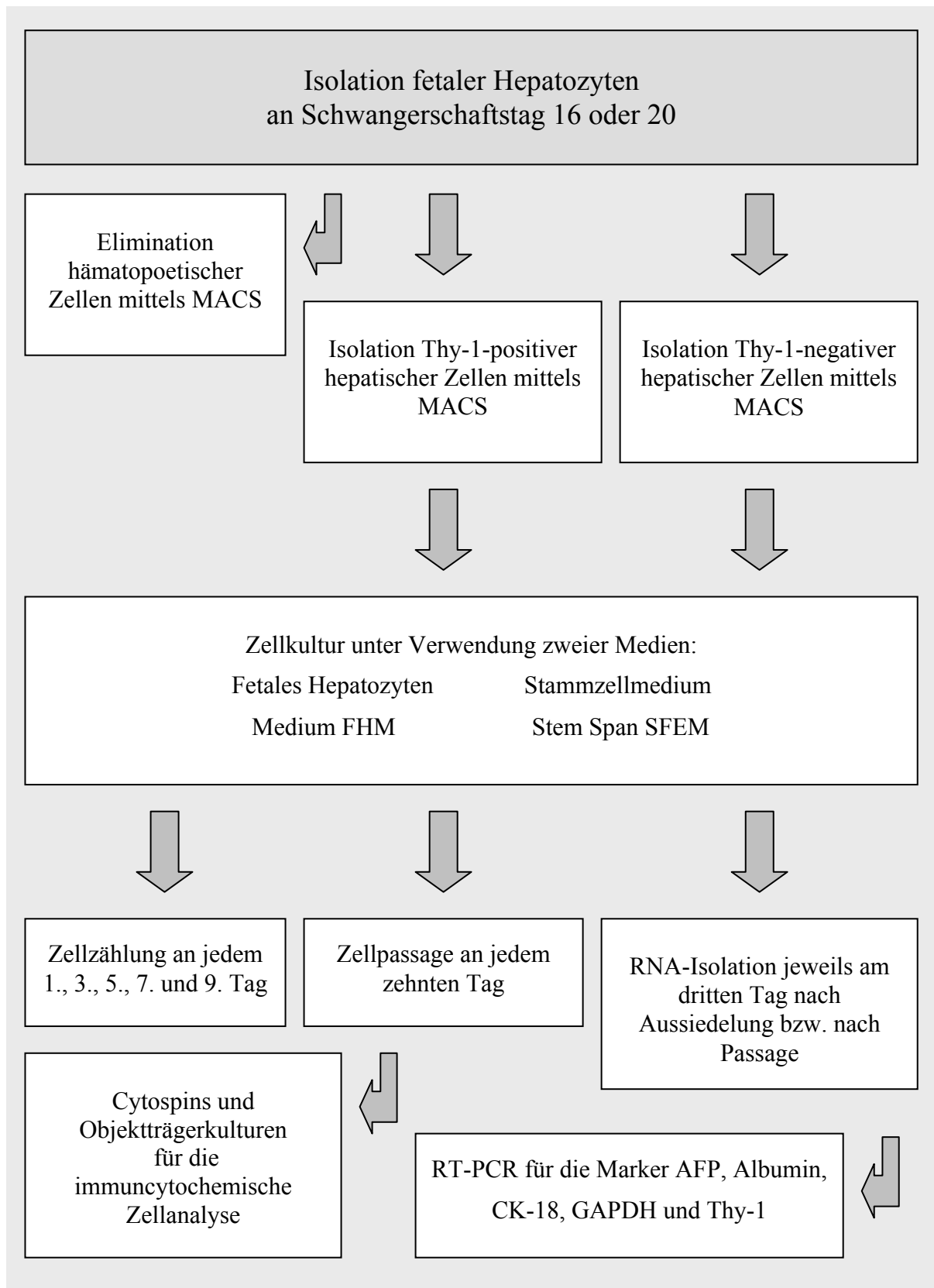


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns.

3.1.2 Zellarten und Kulturbedingungen

In dieser Arbeit werden die Wachstums- und Differenzierungspotentiale von Leberzellen in vitro unter verschiedenen Bedingungen ermittelt (siehe Tabelle 3.2). An Schwangerschaftstag 16 isolierte Leberzellen werden solchen von Schwangerschaftstag 20 gegenübergestellt. Die Zellen werden dabei jeweils in Thy-1-negative Hepatozyten und in Thy-1-positive potentielle Leberstammzellen aufgeteilt und miteinander verglichen. Des Weiteren werden die Einflüsse zweier Medien (Fetales Hepatozyten Medium FHM, Stammzellmedium Stem Span SFEM) auf Wachstum und Differenzierung erforscht.

Kulturmedium	Schwangerschaftstag 16		Schwangerschaftstag 20	
FHM	Thy-1-positiv	Thy-1-negativ	Thy-1-positiv	Thy-1-negativ
Stem Span				

Tabelle 3.2: Darstellung der unterschiedlichen Zellarten sowie der jeweiligen Versuchsbedingungen.

3.2 Materialien und Bezugsquellen

3.2.1 Antikörper zur Elimination der hämatopoetischen Zellen mittels MACS

mAb OX 43 (Serotec, Eching, Deutschland)

mAb OX 44/CD 53 (Serotec, Eching, Deutschland)

Goat-anti-mouse IgG gebunden magnetische Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland)

3.2.2 Antikörper zur Trennung Thy-1-positiver und Thy-1-negativer Zellen mittels MACS

mAb OX 7/CD 90 (mouse-anti-rat Thy-1, Pharmingen, Hamburg, Deutschland)

Goat-anti-mouse IgG gebunden magnetische Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland)

3.2.3 Antikörper der immunhistochemischen Auswertung

mAb OX 7/CD 90 (mouse-anti-rat Thy-1, 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)

3.2.4 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Albumine bovine serum, Fatty acid free	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Aqua dest.	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
BSA (gelöst)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Desinfektionsspray Cutasept	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Diaminobenzidin	Dako, Hamburg, Deutschland
Diethylether	Riedel de Haën, Sigma, Seelze, Deutschland
DNA-Gen-Ruler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNase I	Roche, Mannheim, Deutschland
EDTA	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
EGF	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol 70 %	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
FGF-4	R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland
First strand cDNA synthesis kit	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Hämatoxilin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HBSS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Hepes (gelöst)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hepes (ungelöst)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HGF	AL-Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Insulin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit	Ivitek, Berlin, Deutschland
Kollagen I Lösung, 0,1 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kollagenase Typ IV, 0,6 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
L-Glutamine	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Loading Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Percoll (Dichte 1,124 g/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
SCF	AL-Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Stem Span SFEM	Cell Systems Biotechnologie, St. Katharinen, Deutschland
TAE	Merck, Darmstadt, Deutschland
Taq Polymerase Kit	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau, 0,9 %	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin Inhibitor, soybean	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Williams E without Glutamine	Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

3.2.5 Technische Geräte

Produkt	Hersteller
Akkupipette "pipetus-akku"	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Autoklav "HRM-242 II"	Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland
Certomat	B. Braun Biotech International GmbH, Sartorius Group, Melsungen, Deutschland
Cytozentrifuge "Cytospin 3"	Thermo Fisher Scientific, Thermo Shandon, Waltham, Massachusetts, USA
Dissektionsmikroskop "SZ-40"	Olympus, Hamburg, Deutschland
Gelkammer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Invertoskop "IX-50"	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kulturschrank "Function Line"	Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop für Photos der Immunhistochemie "BX-60"	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop für Zellzählungen "CH-2"	Olympus, Hamburg, Deutschland
OP-Instrumente, div.	div. Hersteller
Pipetten 100-1000 µl, 20-200 µl, 0,1-10 µl	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Rasterokular "WH10X2-H"	Olympus, Hamburg, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler "T personal"	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer "comfort"	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge "MicroCen13"	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Wasserbad, beheizbar	GPL, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer "Neubauer improved"	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge "Biofuge Stratos"	Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland

Tabelle 3.4: Auflistung der verwendeten technischen Geräte.

3.2.6 Verbrauchsmaterial und Glaswaren

Produkt	Hersteller
48-Well-Platten	BD Bioscience, Falcon, San Jose, CA, USA
Einwegspritzen	div. Hersteller
Filter 0,2 µm für Lösungen, "Steritop"	Millipore Corp., Schwalbach, Deutschland
Glasbehältnisse, div.	Schott, Mainz, Deutschland
Glasglocke	div. Hersteller
Injektionskanülen	div. Hersteller
Korkplatten	div. Hersteller
MACS Separation Columns AS und MS	Miltenyi Biotec, Gladbach, Deutschland
Nylogewebe, Maschengröße 40 µm	BD Bioscience, Falcon, San Jose, CA, USA
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Pipettenspitzen für Akkupipette, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Bioscience, Falcon, San Jose, CA, USA
Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipette	Sarstedt, Numbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm, 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Textilklebeband	div. Hersteller
Trichter	div. Hersteller
Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 3.5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Glaswaren.

3.3 Allgemeine Arbeitsmethoden

3.3.1 Sterilisierung der Arbeitsmaterialien

Die Sterilisierung von Flüssigkeiten erfolgt mittels Filtration durch 0,2 µm Filter. Das Operationsbesteck, Glasgeräte und Verbrauchsmaterialien aus Polypropylen, z.B. Eppendorftubes oder Pipettenspitzen, werden bei 2 bar und 120 °C für 20 Minuten autoklaviert.

3.3.2 Zellzentrifugation

Die Zellzentrifugation dient der Gewinnung der zellulären Bestandteile einer Zellsuspension im Rahmen der Zellisolation. Unter Verwendung dieser Methode erfolgt sowohl die Reinigung der Zellen, z.B. von im Überstand befindlichen ungebundenen Antikörpern, als auch die Auftrennung von hepatischen und hämatopoetischen Zellen mittels Dichtezentrifugation. Dabei werden verschiedene Zentrifugationsbedingungen - in nachstehender Tabelle aufgelistet - angewandt.

Zentrifugation	Beschleunigung	Bremse	Gravität	Minuten	Temperatur
1. Zentrifugation Trennung der Zellen von Kollagenaselösung	4	1	450 g	5 min	4 °C
Dichtezentrifugation Elimination hämatopoetischer Zellen	2	1	450 g	20 min	17 °C
3. Zentrifugation Trennung der Zellen von Percollresten	4	1	350 g	10 min	14 °C
4. Zentrifugation Trennung der Zellen von ungebundenem mAb OX 43/44	4	1	450 g	5 min	4 °C
5. Zentrifugation Trennung der Zellen von ungebundenem mAb OX 43/44 und magnet. Microbeads	4	1	450 g	5 min	4 °C
6. Zentrifugation Trennung der Zellen von ungebundenem mAb OX 7	4	1	450 g	5 min	4 °C

Tabelle 3.6: Übersicht der Zentrifugationsbedingungen.

Im Rahmen der Dichtezentrifugation zur Trennung der fetalen Hepatozyten von Zellen des hämatopoetischen Systems werden je nach Isolationszeitpunkt Percoll-Gradienten unterschiedlicher Dichte verwendet (siehe Tabelle 3.7). Als Basis dient eine Percoll-Lösung der Dichte 1,124 g/ml, die in entsprechendem Verhältnis mit PBS verdünnt wird. Die Percoll Konzentrationen liegen dabei zwischen 60,5 % (ED 20) und 75,6 % (ED 16).

Isolationstag	Percoll-Dichte	Percoll	PBS
ED 16	1,095 g/ml	15,1 ml	4,9 ml
ED 20	1,077 g/ml	12,1 ml	7,9 ml

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Percoll-Gradienten.

3.3.3 Trypan-Blau-Zellzählung

Die Anzahl der isolierten Zellen sowie die Zellviabilität werden im Rahmen einer Isolations- bzw. Kulturperiode mehrfach unter Verwendung der Trypan-Blau-Methode bestimmt (siehe Tabelle 3.8). In diesem Verfahren werden unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer die absolute Zellzahl sowie der Anteil der lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die erste Zellzählung erfolgt nach Aufreinigung der isolierten Zellen mittels Dichtezentrifugation. Zu diesem Zweck werden 10 µl der fetalen Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:100 mit 90 µl einer 0,9 %igen Trypan-Blau-Lösung und 900 µl Arbeitspuffer HBSS-C vermengt. Die zweite Zellzählung wird nach Elimination der hämatopoetischen Zellen mittels MACS durchgeführt. Hierfür werden die der Zellsuspension entnommenen 10 µl in einem Verhältnis von 1:50 mit 90 µl der 0,9 %igen Trypan-Blau-Lösung und 400 µl des Arbeitspuffers HBSS-C verdünnt. In einer dritten Zellzählung werden die Thy-1-positiven Zellen getrennt von den Thy-1-negativen Zellen gezählt. Je 10 µl der entsprechenden Zellsuspension werden erneut in einem Verhältnis von 1:50 mit 90 µl der 0,9 %igen Trypan-Blau-Lösung und 400 µl des Arbeitspuffers HBSS-C vermengt. Die Trypan-Blau-Zellzählungen während der Kulturperiode werden jeweils zum Zeitpunkt der Zellpassage durchgeführt. Der Zellsuspension werden wiederum 10 µl entnommen und diese in einem Verhältnis von 1:100 mit 90 µl der 0,9 %igen Trypan-Blau-Lösung und 900 µl Arbeitspuffer HBSS-C versetzt.

Zeitpunkt der Zellzählung	Menge der Zellsuspension	Mischungsverhältnis	Menge der Trypan-Blau-Lösung	Menge des Arbeitspuffers HBSS-C
nach Dichtezentrifugation	10 µl	1:100	90 µl	900 µl
nach Elimination hämatopoetischer Zellen	10 µl	1:50	90 µl	400 µl
nach Zellauftrennung in Thy-1-positiv und Thy-1-negativ	10 µl	1:50	90 µl	400 µl
vor erneuter Aussiedelung bei Passage	10 µl	1:100	90 µl	900 µl

Tabelle 3.8: Übersicht der Zellzählungen mittels Trypan-Blau-Methode.

3.3.4 EDV und statistische Analyse

Die Erfassung der Daten erfolgt unter Verwendung eines PCs mit dem Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional. Die Datenauswertung wird mit Hilfe von Microsoft Excel XP durchgeführt. Die Werte der statistischen Signifikanz werden anhand des Student t Tests ermittelt, wobei P-Werte $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen werden. Die im Rahmen der PCR angefertigten Photos werden mittels einer Digitalkamera Sony Cybershot DSC-W50 aufgenommen. Die Bearbeitung der Bilder erfolgt unter Zuhilfenahme von Adobe Photoshop 6.0. Die Photos der Cytospin-Präparate werden unter Verwendung einer an einen Windows basierten PC angeschlossenen Kamera angefertigt.

3.4 Tiere

Alle Experimente entsprechen den Richtlinien des Tierschutzkomitees des medizinischen Universitätszentrums Hamburg. Die deutschen Vorschriften für die Versorgung und Verwendung von Labortieren werden durchweg eingehalten. Die Feten schwangerer Sprague-Dawley Ratten werden als Organspender genutzt. Die Tiere entstammen der Tierversorgungsabteilung des medizinischen Zentrums der Universität Hamburg. Dort haben die Tiere Zugang zu



Abbildung 3.9: Sprague-Dawley Ratte, Charles-River, Sulzfeld, Deutschland. Quelle: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Velvet_small.jpg>, Abruf vom 17.06.2007, 15h.

Wasser und standardisiertem Rattenfutter *ad libitum*. Des Weiteren werden die Tiere einem 12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus ausgesetzt.

3.5 Isolationslösungen

Jeweils am Vortag der geplanten Isolation werden die benötigten Lösungen unter sterilen Bedingungen hergestellt (siehe Tabelle 3.10). Als Basis dient dabei die Hank's Buffered Saline Solution HBSS. 1 Liter dieser Substanz wird mit 20 ml HEPES 1 M versetzt. Die so entstandene modifizierte HBSS (HBSS mod.) dient wiederum als Grundlage weiterer Lösungen. 100 ml der HBSS mod. bilden mit 100 μ l CaCl_2 und

0,06 g DNase den Startpuffer HBSS-A. Weitere 100 ml der HBSS mod. ergeben mit 10 ml EGTA versetzt den Stopppuffer HBSS-B. 200 ml HBSS mod. werden mit 400 µl EGTA und 1 g BSA zu dem Arbeitspuffer HBSS-C vermengt. Des Weiteren werden 0,18 g Collagenase Typ IV in 17 ml HBSS-A gelöst und die so entstandene Kollagenaselösung mittels Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm) steril filtriert.

HBSS modifiziert	1 l HBSS	20 ml 1 M Hepes	
HBSS-A Startpuffer	100 ml HBSS mod.	100 µl CaCl ₂	0,06 g DNase
HBSS-A /Kollagenase	17 ml HBSS-A	0,18 g Kollagenase	
HBSS-B Stopppuffer	100 ml HBSS mod.	10 ml 50 mM EGTA	
HBSS-C Arbeitspuffer	200 ml HBSS mod.	400 µl 50 mM EGTA	1 g BSA

Tabelle 3.10: Zusammensetzung der Isolationslösungen.

3.6 Kulturmedien

Die Herstellung der Kulturmedien erfolgt unter sterilen Bedingungen. Sie werden bei 7 °C gelagert.

3.6.1 Kulturmedium der fetalen Hepatozyten

Als Kulturmedium der fetalen Hepatozyten dient das Fetale Hepatozyten Medium FHM (siehe Tabelle 3.11): Williams Medium E ohne L-Glutamin, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Hapes, Natriumpyruvat, Magnesiumsulfat, Dexamethason, Epidermal Growth Factor EGF, Insulin, Fetal Calf Serum FCS und Bovine Serum Albumin BSA.

Kulturmedium der fetalen Hepatozyten: Fetales Hepatozyten Medium FHM	
Grundmedium Williams E ohne L-Glutamin	500 ml
L-Glutamin	5,5 ml
Penicillin/Streptomycin	5,5 ml
Hepes	11 ml
Natriumpyruvat	11 ml
Insulin	10 IU
Magnesiumsulfat	100 mg
EGF	5 µg
Dexamethasone	6,25 nmol
BSA (0,1 %)	0,5 g
FCS	50 ml

Tabelle 3.11: Zusammensetzung des Fetalen Hepatozyten Mediums FHM.

3.6.2 Kulturmedium der fetalen Stammzellen

Als Stammzellmedium dient das speziell auf die Bedürfnisse von Stammzellen ausgerichtet Stem Span SFEM (siehe Tabelle 3.12): Stem Span SFEM, Penicillin/Streptomycin, Dexamethasone, Stem Cell Factor SCF, Hepatocyte Growth Factor HGF, Epidermal Growth Factor EGF und Fibroblast Growth Factor FGF-4.

Kulturmedium der fetalen Stammzellen: Stem Span Medium SFEM	
Grundmedium Stem Span Medium	100 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
Dexamethasone	5 ng
SCF	10 µg
HGF	2 µg
EGF	5 µg
FGF-4	1 µg

Tabelle 3.12: Zusammensetzung des fetalen Stammzellmediums Stem Span SFEM.

3.7 Kollagenbeschichtung der Kulturplatten

Die Beschichtung der 48-Well-Kulturplatten erfolgt unter sterilen Bedingungen. Als Basis der Kollagenbeschichtung dient eine 0,1 %ige Kollagen Typ I Lösung. Diese wird in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt und in einer Konzentration von 12,5 µg/cm² in die Wells der zu beschichtenden 48-Well-Platte gegeben. Die beschichteten Kulturplatten werden für mindestens 24 Stunden bei 7 °C gelagert. Die Kollagenlösung wird vor Verwendung der Kulturplatten abgesaugt und die einzelnen Wells mit PBS gespült.

3.8 Zellisolation

3.8.1 Isolation der fetalen Leberzellen

Die Isolation der fetalen Leberzellen erfolgt an Tag 16 bzw. an Tag 20 der Schwangerschaft. Nachdem das Muttertier mittels einer Überdosis Äther unter dem Abzug getötet wurde, erfolgt die Eröffnung des Bauchraumes durch einen V-förmigen Hautschnitt. Die Feten werden samt Uterus entnommen und einzeln aus diesem herauspräpariert. Die Lebern der Feten werden nach Durchtrennung des Ligamentum teres hepatis möglichst komplett und ohne Eröffnung des Darms entnommen. Dieses erfolgt unter dem Dissektionsmikroskop. Je zwei bis drei Lebern werden in ein mit 1 ml modifizierter Hank's Buffered Saline Solution (HBSS mod.) gefülltes Rollrandgläschen überführt. Pro Isolation werden auf diese Weise vier bis achtzehn Lebern gewonnen. Die Lebern werden mit Hilfe einer Schere möglichst fein zerkleinert und auf Eis gestellt.

Für den folgenden Schritt werden pro Rollrandgläschen 0,18 g Collagenase in je 17 ml Startpuffer HBSS-A gelöst und anschließend durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. In einem 36 °C warmen Wasserbad folgt dann der Collagenaseverdau. Jedes Rollrandgläschen wird dafür im Wasserbad positioniert und mit je 5 ml der Collagenaselösung vermengt. In den folgenden 5 Minuten erfolgt unter ständigem Vermischen der Substanzen der Verdau der Lebern. Die im Überstand befindlichen Leberzellen werden in je ein 50 ml Tube überführt und in diesem auf Eis gelagert. Der Vorgang wird insgesamt drei Mal wiederholt, bevor je 10 ml des Stopppuffers HBSS-B in die Rollrandgläschen gegeben werden. Die restlichen, nun in HBSS-B gelösten Leberzellen, werden durch einen 40 µm Nylonfilter in das entsprechende Tube mit dem Überstand filtriert und der Verdau so beendet. Zum Ausgleich der Füllmengen der Tubes dient der Arbeitspuffer HBSS-C.

Die nachfolgende erste Zentrifugation bewirkt die Entstehung eines Zellpellets, welches durch Absaugen von dem kollagenasehaltigem Überstand befreit wird. Dieses Pellet wird darauf folgend in 8 ml Arbeitspuffer HBSS-C resuspendiert. In einer entsprechenden Anzahl Tubes wird für die sich anschließende Percoll-Dichtezentrifugation ein Percoll-Gradient, dem Gestationsalter der Leberzellen angepasst, vorbereitet. Die Zellsuspension wird auf den Percoll-Gradienten gegeben, wobei sich die Substanzen nicht vermischen dürfen. Zu diesem Zweck wird die Zellsuspension langsam entlang des Gefäßrandes auf die Percoll-Mischung gegossen. Die Dichtezentrifugation wird direkt im Anschluss durchgeführt. Auf diesem Wege

erfolgt eine erste Trennung von hämatopoetischen und hepatischen Zellen. Letztere setzen sich als eine weißlich erscheinende Zellschicht auf einem rötlichen Zellgemisch ab und können unter Zuhilfenahme einer 1000 µl Pipette gewonnen werden. Die so isolierten Zellen werden in je ein neues Tube überführt. Zum Ausgleich der Füllmengen der Tubes dient wiederum der Arbeitspuffer HBSS-C. Eine dritte Zentrifugation sowie ein erneutes Absaugen des Überstandes folgen, um die Zellen von Resten der Percoll-Lösung zu trennen. Die Resuspension des Pellets erfolgt in 1000 µl Arbeitspuffer HBSS-C.

Bevor die Zellsuspension auf Eis gelagert wird, werden 10 µl entnommen und mit 90 µl Trypanblau und 900 µl Arbeitspuffer HBSS-C vermengt. Diese Zellverdünnung von 1:100 wird darauf folgend für die erste Zellzählung verwendet. Die Zellzählung erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Gesamtzellzahl aller Tubes liegt dabei zwischen $49,0 \times 10^6$ (ED 16) und $505,0 \times 10^6$ Zellen (ED 20). Mit Hilfe des Trypanblau-Tests wird die Viabilität der Zellen in Prozent ermittelt. Sie liegt zwischen 94,2 % und 100 %.

3.8.2 Elimination hämatopoetischer Zellen mittels MACS

Das Magnetic Cell Sorting (MACS) dient der Elimination der fetalen OX 43- und OX 44- positiven hämatopoetischen Zellen. Der auf Eis gelagerten Zellsuspension wird je 15 µl mAb OX 43 und 2,6 µl mAb OX 44/CD 53 zur Markierung der Zellen des blutbildenden Systems beigefügt. Die folgende Inkubation von 30 Minuten erfolgt weiterhin unter Kühlung auf Eis. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird eine erneute Resuspension in 10 ml Arbeitspuffer HBSS-C vollzogen, welcher sich eine vierte Zentrifugation sowie ein Absaugen des Überstandes anschließen. Auf diesem Weg werden ungebundene Antikörper entfernt. Nach nun folgender Resuspension des Zellpellets in 100 µl Arbeitspuffer HBSS-C werden 20 µl magnetische Microbeads hinzugefügt. Die Microbeads dienen der zweiten Markierung der hämatopoetischen Zellen und sind an Goat-anti-mouse IgG gebunden. Diese Suspension inkubiert nachfolgend für 15 Minuten auf Eis. Die Resuspension erfolgt mit je 400 µl Arbeitspuffer HBSS-C.

Die so gewonnene Zellsuspension wird auf die bereits mit modifiziertem HBSS gespülte Vario-MACS AS Säule gegeben. Die Säule befindet sich in einem magnetischen Feld und absorbierte die positiv markierten hämatopoetischen Zellen. Nicht markierte Zellen werden nach Passage der Säule in einem Tube aufgefangen, wobei jeweils die Inhalte zweier Tubes durch diesen Schritt vereint werden. Die Anzahl

der Tubes wird so um die Hälfte reduziert. Das Nachspülen der Säule erfolgt mit je 5 ml Arbeitspuffer HBSS-C, welcher auch erneut zum Abgleich der Füllmengen der Tubes dient. Die nun durchgeführte fünfte Zentrifugation mit nachfolgendem Absaugen des Überstandes befreit die Zellsuspension von letzten nicht gebundenen Antikörpern. Die Resuspension des Zellpellets erfolgt mit je 1000 µl Arbeitspuffer HBSS-C.

Dieser Zellsuspension werden nun 10 µl entnommen, bevor sie auf Eis gelagert wird. Die 10 µl der Suspension werden mit 90 µl Trypanblau und 400 µl Arbeitspuffer HBSS-C zum Zweck der zweiten Zellzählung vermischt. Auch diese erfolgt mittels einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Gesamtzellzahl aller Tubes liegt nun zwischen $17,0 \times 10^6$ (ED 16) und $180,0 \times 10^6$ Zellen (ED 20). Auch hier wird die Zellviabilität unter Zuhilfenahme des Trypanblau-Tests in Prozent ermittelt. Sie erreicht Werte von 82,9 % bis 100 %.

3.8.3 Isolation Thy-1-positiver und Thy-1-negativer Zellen mittels MACS

In einem zweiten MACS Schritt werden nun die Thy-1-positiven und die Thy-1-negativen Zellen voneinander getrennt. Unter Lagerung auf Eis wird der Zellsuspension je 30 µl mAb OX 7/CD 90 zur primären Markierung der Thy-1-positiven Zellen zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgt eine erneute Resuspension in 2 ml Arbeitspuffer HBSS-C. Die anschließende sechste Zentrifugation mit darauf folgendem Absaugen des Überstandes dient abermals der Eliminierung ungebundener Antikörper. Die so präparierten Zellen werden zunächst in 70 µl Arbeitspuffer HBSS-C resuspendiert und dann mit 30 µl der oben beschriebenen magnetischen Goat-anti-mouse IgG gebundenen Microbeads zur zweiten Markierung der Thy-1-positiven Zellen versetzt.

Nach Ablauf der sich anschließenden Inkubationszeit von 15 Minuten, welche wiederum unter Kühlung auf Eis erfolgt, wird die Zellsuspension mit 1 ml Arbeitspuffer HBSS-C verdünnt und auf die bereits mit Arbeitspuffer HBSS-C gespülte MicroMACS MS Säule gegeben. Diese Säule, erneut in einem magnetischen Feld befindlich, absorbiert nun die markierten Thy-1-positiven Zellen, während die nicht markierten Thy-1-negativen Zellen nach Passage der MACS Säule in einem einzigen Tube aufgefangen werden. Zum Nachspülen der Säule dient 1 ml Arbeitspuffer HBSS-C. Nach Abschluss dieses Vorgangs wird die MACS Säule samt der gebundenen Thy-1-positiven Zellen aus dem magnetischen Feld entfernt und die Thy-1-positiven Zellen mittels 2 ml Arbeitspuffer HBSS-C aus der Säule ausgespült. Die so isolierten Thy-1-positiven Zellen werden nun auch in einem einzigen Tube gesammelt.

Für die nun folgende letzte Zellzählung werden je 10 µl der Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellsuspension entnommen und je 90 µl Trypanblau und je 400 µl Arbeitspuffer HBSS-C zugefügt. Auch diese dritte Zellzählung erfolgt in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Gesamtzellzahl der Thy-1-positiven Zellen liegt zwischen $2,75 \times 10^6$ (ED 16) und $8,0 \times 10^6$ Zellen (ED 20). Die Gesamtzellzahl der Thy-1-negativen Zellen beträgt zwischen $14,0 \times 10^6$ (ED 16) und $148,0 \times 10^6$ Zellen (ED 20). Die Mittels Trypan-Blau-Test ermittelte prozentuale Viabilität liegt für die Thy-1-positiven Zellen zwischen 71,4 % und 100 %, für die Thy-1-negativen Zellen zwischen 85,7 % und 100 %.

3.8.4 Isolationszahlen

Die folgenden Tabellen zeigen die Anzahl der isolierten Zellen im Verlauf der Zellisolationen. Tabelle 3.13 zeigt die Zellzahlen der Isolationen an Schwangerschaftstag 16, Tabelle 3.14 die der Isolationen an Schwangerschaftstag 20.

Zellisolation	Primäres Zellisolat $\times 10^6$	OX 43/44-Depletion $\times 10^6$	MACS-Trennung	
			Thy-1-positiv $\times 10^6$	Thy-1-negativ $\times 10^6$
1	147,0	32,5	2,75	18,0
2	49,0	17,0	3,0	14,0
3	244,0	34,0	3,0	30,0
MW	146,667	27,833	2,917	20,667
STD	$\pm 97,5$	$\pm 9,412$	$\pm 0,144$	$\pm 8,327$

Tabelle 3.13: Isolationszahlen der an Schwangerschaftstag 16 durchgeführten Zellisolationen.

Zellisolation	Primäres Zellisolat x 10 ⁶	OX 43/44-Depletion x 10 ⁶	MACS-Trennung	
			Thy-1-positiv x 10 ⁶	Thy-1-negativ x 10 ⁶
1	505,0	180,0	7,0	148,0
2	418,0	38,0	5,0	50,0
3	357,0	68,0	8,0	93,0
MW	426,667	95,333	6,667	97,0
STD	±74,38	±74,842	±1,528	±49,122

Tabelle 3.14: Isolationszahlen der an Schwangerschaftstag 20 durchgeführten Zellisolationen.

3.9 Zellkultur

Sowohl die Thy-1-positiven als auch die Thy-1-negativen Zellen werden getrennt auf mit Collagen Typ I beschichtete 48-Well Platten ausgesiedelt. Die Zellkonzentration liegt dabei bei je 250.000 Zellen pro Well. Jedes Well wird des Weiteren mit 1 ml Kulturmedium versetzt. Als Kulturmedium dient zum einen das Fetale Hepatozyten Medium FHM, zum anderen das speziell auf die Bedürfnisse von Stammzellen ausgerichtet Stem Span SFEM. Die Zellkulturen verbleiben bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 70 % und 5 % CO₂ Luftgehalt in einem entsprechenden Kulturschrank.

Der Wechsel der Medien sowie die Zählung der Zellen erfolgen erstmals nach 24 Stunden und folgend an jedem zweiten Kulturtag. Die RNA-Isolation wird je an Tag drei nach Aussiedelung bzw. nach Passage der Kultur, die Zellpassage an jedem zehnten Kulturtag durchgeführt.

3.10 Zellzählung und Datenanalyse

An jedem zweiten Tag der Kultur erfolgt eine Zählung der Zellen mittels Lichtmikroskop und Rasterokular unter standardisierten Bedingungen. An vier zufällig gewählten Positionen innerhalb eines Wells wird die Anzahl der Zellen pro ¼ mm² ausgezählt und daraus die Anzahl der Zellen pro mm² errechnet. Dieser Vorgang erfolgt zu jedem untersuchten Kulturzeitpunkt pro Zellkultur in je drei Wells. In der Zusammenstellung der entsprechenden Daten werden der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung der absoluten Zellzahlen ermittelt.

Die Bestimmung der Zellzunahme erfolgt prozentual, wobei die ursprünglich erfolgreich ausgesiedelte bzw. erfolgreich passagierte Zellzahl gleich 100 % gesetzt wird. Die Signifikanz wird mittels Student-t-Test ermittelt. Dieser wird zweiseitig und gepaart oder mit gleicher Varianz angewandt. Zum einen erfolgt die Berechnung der Signifikanz des Zellwachstums innerhalb einer Zellpopulation in dem Zeitraum von neun Tagen nach initialer Aussiedelung bzw. nach Zellpassage. Zum anderen wird das Wachstumspotential einer Zellpopulation an Kulturtag 1 und 9 nach initialer Aussiedelung bzw. nach Zellpassage mit den Wachstumspotentialen der anderen Zellpopulationen zum selben Kulturzeitpunkt verglichen.

3.11 Polymerase Ketten Reaktion zur Bestimmung der Markerexpression

3.11.1 RNA-Isolation

Jeweils am dritten Tag nach der primären Aussiedelung bzw. nach der Passage der Zellen erfolgt die Isolation von RNA mit Hilfe des Invisorb Spin Cell RNA™ Mini-Kit. Pro Zellart und pro Kulturmedium werden je drei Wells der besiedelten 48-Well Platte zur RNA-Isolation genutzt. Nachdem die Zellen von dem alten Medium befreit wurden, erfolgt ein Spülen der Platten mit PBS. Anschließend werden je 650 µl Lysis Solution R den entsprechenden Wells zugefügt. Durch diesen Schritt werden die Zellen von dem Boden der Wells gelöst und können mittels einer 1000 µl Pipette gewonnen werden. Es ist dabei darauf zu achten, Zellklumpen zu vermeiden.

Ein DNA bindender Spin Filter wird in einem Auffangtube positioniert und anschließend das Zelllysat direkt auf den Filter überführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute erfolgt eine Zentrifugation der Zellen für 2 Minuten bei 12,000 rpm unter Verwendung einer Tischzentrifuge. So wird die im Lysat befindliche DNA durch den Filter absorbiert, welcher nun verworfen werden kann.

Das RNA enthaltende Zelllysat wird folgend mit 650 µl 70 %igem Ethanol vermischt und direkt auf einen RNA bindenden Spin Filter gegeben. Auch dieser Filter ist zuvor in einem Auffangtube platziert worden. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 1 Minute und einer Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10,000 rpm kann die den Filter passierte Flüssigkeit entsorgt werden. Der die RNA enthaltende Filter und das Auffangtube werden für die folgenden Schritte weiterhin verwendet. Nun werden 600 µl des Waschpuffers R1 auf den RNA bindenden Spin Filter gegeben. Während einer Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10,000 rpm passiert der Waschpuffer den Filter und

kann im Anschluss verworfen werden. Dieser sowie die beiden folgenden Schritte dienen der Elimination von Verunreinigungen und Zellresten aus dem RNA bindenden Filter. Es werden folgend 500 µl des Waschpuffers R2 auf den RNA bindenden Filter gegeben und dieser für 30 Sekunden bei 10,000 rpm zentrifugiert. Der Waschpuffer befindet sich nach Ablauf der Zentrifugation im Auffangtube und kann entfernt werden. Dieser letzte Schritt wird noch einmal wiederholt. Um jegliche Spuren des Ethanol aus dem RNA bindenden Filter zu entfernen, wird dieser für 3 Minuten bei 12,000 rpm zentrifugiert. Das Auffangtube kann dann verworfen und der Filter in ein RNase freies Tube überführt werden.

Nachdem 75 µl des Elutionspuffers R direkt auf die Filtermembran gegeben wurden, erfolgt eine letzte Inkubation für 2 Minuten mit einer sich anschließenden Zentrifugation für 1 Minute bei 10,000 rpm. Die im Filter gebundene RNA wird auf diese Weise gelöst und der Filter kann entsorgt werden. Die so gewonnene RNA wird sofort auf Eis gekühlt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

3.11.2 c-DNA-Synthese

Um aus dieser RNA c-DNA zu synthetisieren wird das First-Strand c-DNA Synthese Kit verwendet. Die extrahierte RNA wird unter Kühlung auf Eis langsam aufgetaut. In der Annahme das 20 µl der RNA Probe 1 µg RNA enthalten, werden 20 µl der RNA entnommen und für 10 Minuten bei 65 °C im Thermoblock inkubiert. Währenddessen wird der Mix für die Reverse Transkriptase vorbereitet. Pro zu transkribierender RNA Probe werden 11 µl Bulk Mix, 1 µl dTT und 1 µl PdN₆ in einem 1,5 ml Eppendorf Tube vermengt. Die Durchmischung der Substanzen wird mittels Vortex und anschließender Zentrifugation gewährleistet. Jeder RNA Probe werden 13 µl des RT-Mixes zugefügt. Das Gesamtvolumen von 33 µl wird erneut mittels Vortex und folgender Zentrifugation durchmischt, bevor es für 60 Minuten bei 37 °C im Thermoblock inkubiert wird. Jeder Probe wird nach Ablauf der Inkubationszeit 17 µl RNase- und DNase-freies Wasser beigemischt. Die so gewonnene c-DNA wird bei – 20 °C gelagert. Die verbleibenden RNA Proben werden erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei – 80 °C verwahrt.

3.11.3 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase Ketten Reaktion PCR erfolgt für die Primer AFP, Albumin, GAPDH, CK-18 und Thy-1 (siehe Tabelle 3.16) unter Verwendung des Taq Polymerase-Kits. Für AFP wird dabei eine nested PCR durchgeführt. H₂O-Negativ-Kontrollen werden bei jeder PCR mitgeführt. Die c-DNA wird mit Dd H₂O, PCR Puffer, dNTP-Mix, MgCl₂, Primer und Polymerase im in nachstehender Tabelle 3.15 dargestellten Verhältnis vermengt.

c-DNA	Dd H ₂ O	PCR Puffer 10x	dNTP-Mix 10 mM	MgCl ₂ 50 mM	forward Primer P1 50 ng/μl	reverse Primer P2 50 ng/μl	Polymerase
7 μl	33 μl	5 μl	1 μl	1,5 μl	1 μl	1 μl	0,5 μl

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des PCR-Mixes.

Primer	Anzahl der Zyklen	Annealing Temperatur in Grad Celsius	Zeit in Sekunden	Anzahl der Basenpaare
GAPDH	30	60	60	593
Thy-1	29	52		343
CK-18	30	60	60	518
AFP 1	35	55	60	
AFP 2 (nested)	30	60	60	619
Albumin	25	60	60	416

Tabelle 3.16: RT-PCR-Parameter.

Die PCR erfolgt in einem programmierbaren Biometra Uno-Thermoblock (siehe Tabelle 3.17). Die Proben werden erst bei 94 °C für 10 Minuten denaturiert. Es folgt der PCR-Zyklus mit 25 bis 35 Wiederholungen. Der Zyklus beinhaltet eine Phase der Denaturierung von einer Minute bei 94 °C, eine Annealingphase von einer Minute bei 52 bis 60 °C und eine Elongationsphase von einer Minute bei 72 °C. Nach Abschluss des PCR-Zyklus werden die Proben für 4 Minuten bei einer Temperatur von 72 °C gehalten und anschließend auf 4 °C gekühlt. Die Proben werden dem Thermoblock entnommen und mit je 10 μl eines Loading Puffers angefärbt, bevor sie bei 4 °C gelagert werden.

Für die nested PCR des AFP wird das Amplifikat der AFP Probe dem Thermoblock entnommen und für eine weitere Amplifikation vorbereitet. Es werden 7 μl des Amplifikates mit 43 μl des oben beschriebenen PCR-Mixes, bestehend aus PCR-Puffer, dNTPs, MgCl₂, Dd H₂O, Forward Primer P3, Reverse Primer P4 und Taq Polymerase, vermengt und erneut in den Thermoblock überführt. Nach einer Inkubationszeit von

10 Minuten bei 94 °C folgt nun ein PCR-Zyklus mit 30 Wiederholungen, welcher ebenfalls eine Denaturierung, eine Annealingphase bei 60 °C und eine Elongation umfasst. Auch hier schließen sich eine Phase von 4 Minuten bei 72 °C sowie eine Abkühlungsphase auf 4 °C an. Die Proben werden ebenfalls mit je 10 µl eines Loading Puffers angefärbt und im Anschluss bei 4 °C gelagert.

Denaturierung für 10 min bei 94 °C					
Beginn des PCR-Zyklus					
Anzahl der Wiederholungen					
AFP I	AFP II	Albumin	CK-18	GAPDH	Thy-1
35	30	25	30	30	29
Denaturierung für 1 min bei 94 °C					
Annealing für 1 min bei (°C)					
AFP I	AFP II	Albumin	CK-18	GAPDH	Thy-1
55	60	60	60	60	52
Elongation für 1 min bei 72 °C					
Ende des PCR-Zyklus					
4 min bei 72 °C					
Abkühlung auf 4 °C					

Tabelle 3.17: Ablauf der PCR.

AFP I	
Sense	5'-AAC AGC AGA GTG CTG CAA AC-3'
Antisense	5'-AGG TTT CGT CCC TCA GAA AG-3'
AFP II (nested)	
Sense	5'-CAC CAT CGA GCT CGC CTA TT-3'
Antisense	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'
CK-18	
Sense	5'-GGA CCT CAG CAA GAT CAT GGC-3'
Antisense	5'-CCA CGA TCT TAC GGG TAG TTG-3'
GAPDH	
Sense	5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT AC-3'
Antisense	5'-GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC-3'
Thy-1	
Sense	5'-CGC TTT ATC AAG GTC CTT ACT C-3'
Antisense	5'-GCG TTT TGA GAT ATT TGA AGG T-3'

Tabelle 3.18: Sequenzen der verwendeten Primer.

3.11.4 Gel-Elektrophorese

Für die Herstellung eines 1 %-igen Agarosegels werden 2 g Agarose in 200 ml 0,5 %igem TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle 2-3 Minuten unter wiederholtem Umrühren erhitzt. Die so entstandene klare Flüssigkeit wird mit 8 µl Ethidiumbromid versetzt und dann zu einem Gel gegossen. Das ausgehärtete Gel wird zur direkten Verwendung in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die im Gel befindlichen 20 Slots werden je mit 10 µl einer Probe bestückt. Die erste Gelkammer bleibt dabei einem 100 bp DNA-Marker, die zweite Kammer der H₂O-Negativ-Kontrolle vorbehalten. Das Stromfeld der Elektrokammer wird für 50 Minuten bei 120 Volt aktiviert. Nach Ablauf dieser Zeit kann das Gel der Elektrokammer entnommen und mittels einer Digitalkamera unter UV-Licht fotografiert werden. Die Größe der PCR Fragmente kann unter Berücksichtigung des DNA-Markers ermittelt werden.

3.12 Passage der Zellkultur

An jedem zehnten Tag der Kultur erfolgt eine Passage der Zellen. Zunächst werden die Zellen von dem alten Medium befreit und die Wells anschließend mit PBS gespült. Nicht angewachsenen Zellen und Zellreste werden so eliminiert. Pro Well werden 300 µl Trypsin/EDTA hinzugefügt, welches das Ablösen der Zellen vom Boden des Wells bewirkt. Dieser Prozess kann unter dem Mikroskop beobachtet werden und wird mittels Zugabe von je 1 ml FCS-haltigem FHM pro Well beendet. Folgend wird die Zellsuspension mit Hilfe einer 1000 µl Pipette gewonnen und in ein Tube überführt. Die Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellen bleiben dabei, auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Medien, voneinander getrennt.

Während die Wells zur Gewinnung verbliebener Zellen mit PBS gespült werden, werden die bereits gelösten Zellen für 5 Minuten bei 450 g, 4 °C, Beschleunigungseinstellung 4 und Bremseinstellung 1 zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wird vom Überstand befreit, bevor die restlichen, nun in PBS gelösten Zellen, dem jeweiligen Tube zugeführt werden. Eine erneute Zentrifugation unter Beibehaltung der Zentrifugationsbedingungen sowie ein weiteres Absaugen des Überstandes schließen sich an und ergeben wiederum ein Zellpellet. Dieses wird in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert.

Je 10 µl der Zellsuspension werden entnommen und mit 90 µl Trypan-Blau und 900 µl Kulturmedium vermischt. Mittels einer Neubauer Zählkammer erfolgt eine Zählung der Zellen sowie die Bestimmung der Zellviabilität. Die Zellen werden entsprechend ihrer

Ursprungsdichte von 250.000 Zellen pro Well auf einer mit Collagen Typ I beschichteten 48-Well Platte ausgesiedelt.

3.13 Cytospins, Objektträgerkulturen und Immuncytochemie zur Bestimmung der Markerexpression

3.13.1 Anfertigung von Cytospins und Objektträgerkulturen

An jedem zehnten Tag der Kultur werden Cytospins und Objektträgerkulturen der Zellen angefertigt. Die Zellen werden zu diesem Zweck von ihrem alten Medium befreit und mit PBS gespült. Zur Ablösung der Zellen von ihrem Untergrund werden 5 ml Trypsin/EDTA auf die entsprechenden Wells verteilt. Unter mikroskopischer Sicht kann dieser Vorgang kontrolliert und bei Bedarf mit FCS-haltigem FHM beendet werden. Die Zellsuspension wird in ein Tube überführt und für 3 Minuten bei 4 °C, 50 g, Beschleunigungs- und Bremseinstellung 4 zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wird vom Überstand befreit und im Anschluss in 1 ml PBS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration mittels Trypan-Blau-Methode werden pro geplantem Cytospin 2×10^6 Zellen mit 200 µl PBS vermengt. Die Zellsuspension wird anschließend mittels Cytozentrifuge bei 750 rpm für 5 Minuten und mittlerer Beschleunigung auf den Objektträger übertragen.

Die Fixierung der Cytospins wird jeweils am Folgetag durchgeführt. Die Cytospins werden hierfür erst für 5 Minuten bei – 20 °C mit Methanol und im Anschluss für 30 Sekunden bei 4 °C mit Aceton behandelt. Die fertig gestellten Cytospins werden bei – 20 °C gelagert.

Zur Herstellung der Objektträgerkulturen werden die Zellen bei der initialen Aussiedelung, bzw. nach der Zellpassage direkt in die Kammern des Objektträgers überführt. Die Zelldichte liegt bei 250.000 Zellen pro Kammer. Die Zellfixierung erfolgt am dritten Kulturtag in bereits geschilderter Form.

3.13.2 Immunzytochemie

Die immunzytochemische Analyse wird zum einen mittels monoklonaler Antikörper der Maus, spezifisch für Thy-1 und CK-18, zum anderen mittels monoklonaler Kaninchen-Antikörper, spezifisch für AFP, durchgeführt. Des Weiteren werden polyklonale FITC-markierte anti-Ratte Albumin Antikörper verwendet.

Die Anfärbung der CK-18- oder Thy-1-positiven Zellen wird unter Verwendung der Alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase-Technik (APAAP) vollzogen. Die

Konzentration der Antikörper liegt dabei bei 2 % für Thy-1 und 10 % für CK-18. Zur zweiten Markierung der positiven Zellen dienen die monoklonalen Kaninchen-anti-Maus IgG mAb in einer Konzentration von 2 %. Die Objektträger werden mit Maus-APAAP-Komplexen inkubiert, bevor Neofuchsin als Substrat der alkalischen Phosphatase für die Anfärbung der Zellen hinzugefügt wird.

Für die Anfärbung der Albumin-positiven Zellen werden die Objektträger nach der Blockade der endogenen Peroxidase mittels 3 % H₂O₂ mit primären Antikörpern in einer Konzentration von 0,2 % inkubiert. Die sekundäre Markierung erfolgt mittels HRP-konjugierten Kaninchen-anti-FITC Antikörpern, welche in einem Verhältnis von 1:100 konzentriert sind. Diamino-Benzidin löste die Färbungsreaktion aus. Die Gegenfärbung erfolgt mittels Hämatoxylin.

Die AFP-Färbung erfolgt in ähnlicher Weise. Eine Inkubation mit dem 1:500 verdünnten primären Antikörper schließt sich der Blockade der endogenen Peroxidase mittels 3 % H₂O₂ an. Die sekundäre Markierung erfolgt mittels HRP-konjugierten Schwein-anti-Kaninchen IgG Antikörpern, welche in einem Verhältnis von 1:50 konzentriert sind. Auch hier löst Diamino-Benzidin die Färbungsreaktion aus und die Gegenfärbung erfolgt mittels Hämatoxylin.

4 Ergebnisse

4.1 Absolutes Zellwachstum in Kultur

Die folgenden Graphiken und Tabellen zeigen das Wachstumsverhalten der untersuchten Zellkulturen in absoluten Zellzahlen. Die Daten werden mittels standardisierter Zellzählung an jedem zweiten Tag der Zellkultur unter zu Hilfenahme eines Mikroskops mit Rasterokular ermittelt. An vier zufällig gewählten Positionen innerhalb eines Wells erfolgt die Auszählung der Zellzahl pro ¼ mm². Aus diesen vier Werten wird die Anzahl der Zellen pro mm² errechnet. An jedem zu untersuchenden Kulturzeitpunkt erfolgt dieser Vorgang pro Zellpopulation in je drei Wells. Die Mittelwerte sind folgend mit jeweiliger Standardabweichung und p-Wert aufgeführt.

Die Abbildungen 4.1 und 4.2 zeigen die Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen. Abbildung 4.1 bezieht sich dabei auf die Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM, Abbildung 4.2 auf die Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen die Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen. Abbildung 4.3

bezieht sich wiederum auf die Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM, Abbildung 4.4 auf die Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM.

4.1.1 Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in absoluten Zellzahlen

Die Thy-1-positiven Zellen des 16. Gestationstages zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM nach den ersten drei Passagen ein positives, wenn auch gering ausgeprägtes Zellwachstum.

An Tag 1 der Kultur liegen durchschnittlich $306,933 \pm 46,483$ Zellen pro mm^2 vor. Diese Zellzahl verringert sich in den folgenden Kulturtagen auf $221,333 \pm 123,426$ Zellen pro mm^2 an Tag 9 der Zellkultur [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,001306467].

Nach der ersten Passage liegt die Zelldichte an Tag 11 bei $53,556 \pm 11,089$ Zellen pro mm^2 . Die maximale Zellzunahme in dieser Zellpassage auf $74 \pm 8,931$ Zellen pro mm^2 wird an Tag 13 der Zellkultur erreicht. An Tag 19 sind es noch $61,556 \pm 12,659$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,131541814].

Nach abgeschlossener zweiter Zellpassage liegen an Tag 21 $37,611 \pm 8,576$ Zellen pro mm^2 vor. Die höchste Zelldichte wird mit $50,778 \pm 26,603$ Zellen pro mm^2 an Tag 27 verzeichnet. Die Zellzahl geht bis Tag 29 auf $41,333 \pm 27,183$ Zellen pro mm^2 zurück [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,636034723].

Nach der dritten Zellpassage liegen an Tag 31 $51,667 \pm 14,552$ Zellen pro mm^2 vor. An Tag 39 der Zellkultur liegt die Zellzahl durchschnittlich bei $57,833 \pm 35,879$ Zellen pro mm^2 und weist damit zum letzten Mal in dieser Kultur ein Zellwachstum auf [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,288055652].

Im Verlauf der folgenden zwei Passagen reduziert sich die Zellzahl von $42,833 \pm 14,786$ Zellen pro mm^2 an Tag 41, über $35,778 \pm 14,526$ Zellen pro mm^2 an Tag 49 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 4,91816E-05] und $29,5 \pm 9,841$ Zellen pro mm^2 an Tag 51 auf $13,944 \pm 6,384$ Zellen pro mm^2 an Tag 59 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 9,47598E-08].

Nach einer letzten sechsten Passage setzt sich dieser Trend fort, so dass an Tag 61 noch $11,611 \pm 6,147$ Zellen pro mm^2 , an Tag 69 nur noch $6,167 \pm 2,041$ Zellen pro mm^2 ermittelt werden [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,000181641].

Die an ED 16 isolierten Thy-1-negativen Zellen zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM ein vergleichsweise höheres Zellwachstum, welches auch nach der fünften Passage noch nachgewiesen wird.

An Tag 1 der Kultur liegen in dieser Zellpopulation durchschnittlich $530,867 \pm 94,813$ Zellen pro mm^2 vor. An Tag 5 der Kultur wird eine Zellzunahme auf $607,222 \pm 195,008$ Zellen pro mm^2 festgestellt. Vor der ersten Passage sind es an Tag 9 noch $403,944 \pm 192,562$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,000542938].

In den folgenden Kulturtagen wird eine Zunahme der Zelldichte von $297,889 \pm 123,088$ Zellen pro mm^2 an Tag 11 auf $388,222 \pm 115,375$ Zellen pro mm^2 an Tag 19 gezeigt [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,123319656].

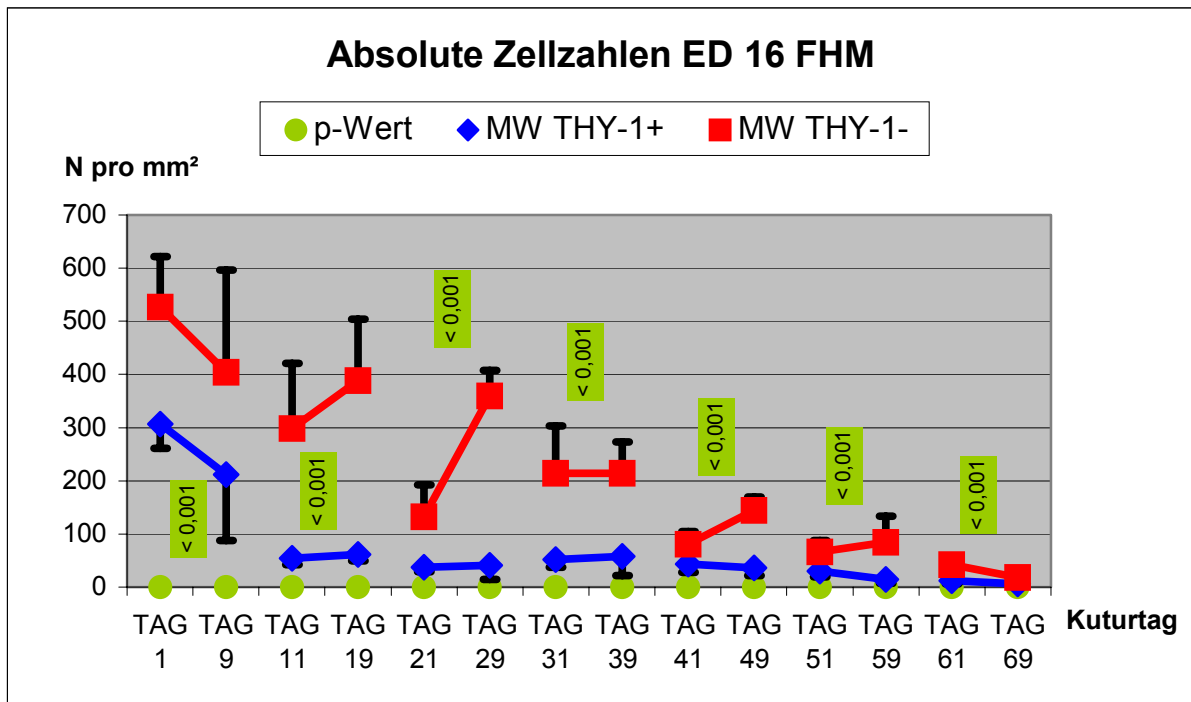
An Tag 21 liegt die Zellzahl bei $132,444 \pm 60,288$ Zellen pro mm^2 und erreicht an Tag 29 mit $359,889 \pm 47,386$ Zellen pro mm^2 die maximale Zellzunahme nach der zweiten Passage [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 4,19682E-08].

An Tag 31 und nach einer weiteren Passage liegen $213,556 \pm 89,842$ Zellen pro mm^2 vor. Diese Zellzahl bleibt in den nächsten Kulturtagen annähernd konstant und liegt an Tag 39 bei $214,611 \pm 58,323$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,969948393].

Nach der sich anschließenden vierten Passage zeigt sich eine Zellzunahme von $80,5 \pm 23,799$ Zellen pro mm^2 an Tag 41 auf $144,556 \pm 25,056$ Zellen pro mm^2 an Tag 49 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 6,3478E-10].

Ein positives Zellwachstum kann auch nach beendeter fünfter Passage nachgewiesen werden. So liegen an Tag 51 $66,278 \pm 22,093$ Zellen pro mm^2 und an Tag 59 $84,167 \pm 49,624$ Zellen pro mm^2 vor [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,01822465].

Nach den letzten beiden Passagen reduziert sich dann auch in dieser Kultur die Zellzahl von $42,611 \pm 13,245$ Zellen pro mm^2 an Tag 61 über $18,278 \pm 3,102$ Zellen pro mm^2 an Tag 69 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 7,96393E-08] auf letztlich $7,333 \pm 2,503$ Zellen pro mm^2 an Tag 73.



mm ²	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29	Tag 31
MW THY-1+	306,93	211,33	53,56	61,56	37,61	41,33	51,67
MW THY-1-	530,87	403,94	297,89	388,22	132,44	359,89	213,56
STD THY-1+	46,483	123,426	11,089	12,659	8,576	27,183	14,552
STD THY-1-	94,813	192,562	123,088	115,375	60,288	47,386	89,842

mm ²	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59	Tag 61	Tag 69
MW THY-1+	57,83	42,83	35,78	29,5	13,94	11,61	6,17
MW THY-1-	214,61	80,5	144,56	66,28	84,17	42,61	18,28
STD THY-1+	35,879	14,786	14,526	9,841	6,384	6,147	2,041
STD THY-1-	58,323	23,799	25,056	22,093	49,624	13,245	3,102

Abbildung 4.1: Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der absoluten Zellzahlen pro mm², deren Standardabweichung sowie die p-Werte. Die Graphik zeigt das signifikant stärkere Zellwachstum der Thy-1-negativen Zellen mit Ausnahmen nach der dritten und der sechsten Zellpassage.

4.1.2 Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM in absoluten Zellzahlen

Die an ED 16 isolierten Thy-1-positiven Zellen zeigen unter Kultivierung mit dem Stem Span Medium ein ausgeprägt unregelmäßiges Wachstum, mit einem Wachstumsmaximum nach der dritten Passage.

An Tag 1 der Zellkultur liegen durchschnittlich $487,333 \pm 61,254$ Zellen pro mm^2 vor. An Tag 7 wird mit $1076,722 \pm 675,307$ Zellen pro mm^2 die maximale Zelldichte ermittelt. An Tag 9 ist ein Rückgang der Zellzahl auf $729,833 \pm 370,176$ Zellen pro mm^2 zu verzeichnen [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,014362095].

Nach der ersten Passage liegen an Tag 11 $282,444 \pm 117,795$ Zellen pro mm^2 und an Tag 19 noch $271,944 \pm 86,602$ Zellen pro mm^2 vor [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,805961478].

An Tag 21 und nach vollendeter zweiter Passage wird eine Zelldichte von $187,222 \pm 103,704$ Zellen pro mm^2 aufgezeigt. Dieses vermindert sich bis an Tag 29 auf $87,722 \pm 35,678$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 1,43481E-05], bevor nach der dritten Passage die maximale Zellzunahme von $116,056 \pm 50,613$ Zellen pro mm^2 an Tag 31 auf $583,611 \pm 667,262$ Zellen pro mm^2 an Tag 39 festgestellt wird [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,005101369].

An Tag 41 liegen im Durchschnitt $282,611 \pm 274,101$ Zellen pro mm^2 vor. An Tag 49 ist diese Zellzahl auf $219,778 \pm 260,404$ Zellen pro mm^2 gesunken [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 1,41229E-08].

Nach der nächsten Passage kann erneut eine Zunahme der Zellzahl von $133,722 \pm 161,948$ Zellen pro mm^2 an Tag 51 auf $189,722 \pm 235,791$ Zellen pro mm^2 an Tag 55 bzw. auf $176,667 \pm 233,191$ Zellen pro mm^2 an Tag 59 verzeichnet werden [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,021336847].

An Tag 61 liegen dann durchschnittlich $101,833 \pm 127,982$ Zellen pro mm^2 , an Tag 67 $192,333 \pm 7,174$ Zellen pro mm^2 und an Tag 69 noch $189,167 \pm 7,901$ Zellen pro mm^2 vor [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 6,27538E-07].

Nach der letzten und siebten Passage nimmt die Zellzahl rapide ab und ergibt an Tag 71 $130,5 \pm 9,649$ Zellen pro mm^2 , an Tag 75 nur noch $17,667 \pm 2,944$ Zellen pro mm^2 .

Die an ED 16 isolierten Thy-1-negativen Zellen zeigen unter Kultivierung mit Stem Span Medium ein bis zur siebten Passage anhaltendes Zellwachstum, wobei dieses nach der dritten Passage einmalig ausbleibt.

An Tag 1 liegen hierbei im Durchschnitt $893,467 \pm 103,32$ Zellen pro mm^2 vor. An Tag 9 der Kultur liegt die Zellzahl bei $1795,389 \pm 356,046$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $8,14352\text{E-}09$].

An Tag 11 werden $442,389 \pm 101,132$ und an Tag 19 $573,778 \pm 268,174$ der Zellen pro mm^2 nachgewiesen [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $0,134850713$].

Nach der zweiten Passage wird eine zunehmende Zelldichte von $299,556 \pm 84,058$ Zellen pro mm^2 an Tag 21 auf $630,556 \pm 502,645$ Zellen pro mm^2 an Tag 29 gesehen [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $0,009789733$].

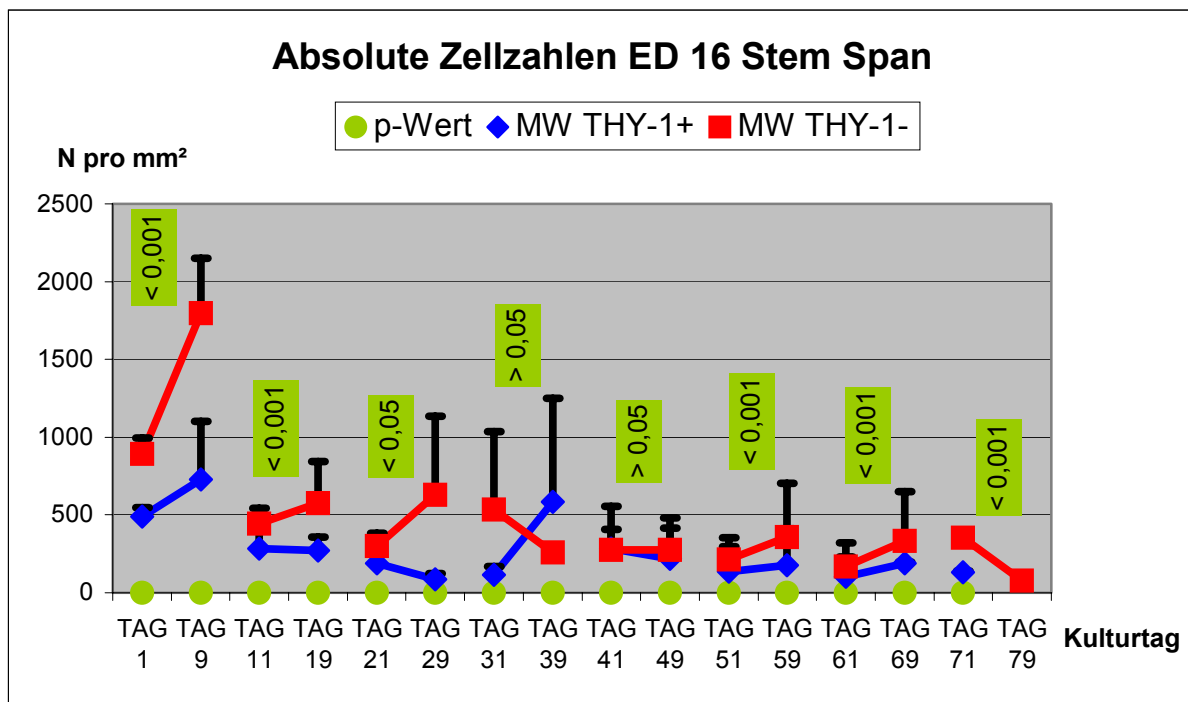
Ein solches Zellwachstum bleibt nach der dritten Passage aus und die Zellzahl fällt von $535,944 \pm 499,599$ Zellen pro mm^2 an Tag 31 auf $236,222 \pm 63,342$ Zellen pro mm^2 an Tag 37 ab. An Tag 39 zeigt sich eine Umkehr dieser Tendenz. Die Zellzahl steigt leicht auf $258,056 \pm 31,512$ Zellen pro mm^2 an [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $0,025328617$].

Nach vollzogener vierter Zellpassage liegen an Tag 41 $276,333 \pm 131,954$ der Zellen pro mm^2 vor. Die Zelldichte mindert sich im Verlauf und wird an Tag 49 mit $277,278 \pm 138,557$ Zellen pro mm^2 vermerkt [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $0,891335783$].

An Tag 51 und nach der fünften Passage liegt die Zelldichte bei $214,5 \pm 140,664$ Zellen pro mm^2 . Die maximale Zunahme der Zellzahl nach dieser Passage wird mit durchschnittlich $381,722 \pm 329,856$ Zellen pro mm^2 an Tag 57 ermittelt. An Tag 59 liegt die Zellzahl bei $359,444 \pm 344,144$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $0,009589585$].

Auch nach der sechsten Passage zeigt sich eine Steigerung der Zellzahl von $169,778 \pm 151,527$ Zellen pro mm^2 an Tag 61 auf $333,75 \pm 314,183$ Zellen pro mm^2 an Tag 69 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $0,057715408$].

Nach der siebten und damit letzten Passage sinkt die Zelldichte von $354,333 \pm 9,07$ Zellen pro mm^2 an Tag 71 auf $80 \pm 10,789$ Zellen pro mm^2 an Tag 79 ab [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: $1,10851\text{E-}07$].



mm ²	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29	Tag 31	Tag 39
MW THY-1+	487,3	729,8	282,4	271,9	187,2	87,8	116,1	583,6
MW THY-1-	893,5	1795,4	442,4	573,8	299,6	630,6	535,9	258,1
STD THY-1+	61,254	370,176	117,795	86,602	103,704	35,678	50,613	667,262
STD THY-1-	103,32	356,046	101,132	268,174	84,058	502,645	499,599	31,512

mm ²	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59	Tag 61	Tag 69	Tag 71	Tag 79
MW THY-1+	282,6	219,8	133,7	176,7	101,08	189,2	130,5	
MW THY-1-	276,3	277,3	214,5	359,4	169,8	333,8	354,3	80
STD THY-1+	274,101	260,404	161,948	233,191	127,982	7,901	9,649	
STD THY-1-	131,951	138,557	140,664	344,144	151,527	314,183	9,07	10,789

Abbildung 4.2: Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der absoluten Zellzahlen pro mm², deren Standardabweichung sowie die p-Werte. Die Thy-1-negativen Zellen zeigen ein stärkeres, überwiegend signifikant stärkeres Zellwachstum mit Ausnahmen nach der dritten Zellpassage.

4.1.3 Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in absoluten Zellzahlen

Die Kulturen der an ED 20 isolierten Thy-1-positiven Zellen zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM bis zur vierten Passage eine Steigerung der Zellzahl.

In den ersten neun Tagen der Kultur wird eine Zunahme der Zellzahl von $291,083 \pm 169,923$ Zellen pro mm^2 an Tag 1 auf $375,778 \pm 144,188$ Zellen pro mm^2 an Tag 9 beobachtet [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,229147326].

Nach der primären Passage der Zellen wird eine steigende Zelldichte von $83,889 \pm 39,854$ Zellen pro mm^2 an Tag 11 auf $277,667 \pm 82,081$ Zellen pro mm^2 an Tag 15 festgestellt. An Kulturtag 19 ist ein Rückgang auf $129 \pm 46,29$ Zellen pro mm^2 zu verzeichnen [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 5,78914E-06].

Nach der zweiten Passage liegen an Tag 21 durchschnittlich $62,333 \pm 6,576$ Zellen pro mm^2 vor. Die maximale Zellzunahme wird mit $105,444 \pm 56,114$ Zellen pro mm^2 an Tag 25 der Kultur ermittelt. Die Zelldichte vor der dritten Passage, an Kulturtag 29, liegt bei $83,667 \pm 48,6$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,225378313].

Nach der dritten Passage wird eine geringe Zunahme von $40,222 \pm 8,438$ Zellen pro mm^2 an Tag 31 auf $43,444 \pm 27,942$ Zellen pro mm^2 an Tag 39 gezeigt [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,673083953].

Im Rahmen der folgenden zwei Passagen nimmt die Zellzahl kontinuierlich ab. Werden an Tag 41 noch $20,444 \pm 11,62$ Zellen pro mm^2 verzeichnet, so sind es an Tag 49 nur noch $15,778 \pm 9,68$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,072884352] und nach einer weiteren fünften Passage an Tag 51 noch $19,5 \pm 2,429$ Zellen pro mm^2 und an Tag 55 noch $18,167 \pm 2,317$ Zellen pro mm^2 .

Die Kulturen der an ED 20 isolierten Thy-1-negativen Zellen zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM eine Steigerung der Zellzahl bis zur fünften Zellpassage.

In den ersten neun Tagen der Kultur zeigt sich eine Zunahme der Zellzahl von $439,417 \pm 124,736$ Zellen pro mm^2 an Tag 1 auf $736,667 \pm 469,73$ Zellen pro mm^2 an Tag 9 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,023022709], wobei das Maximum schon an Tag 7 mit $881,167 \pm 759,503$ Zellen pro mm^2 beobachtet wird.

Nach der ersten Passage wird eine Steigerung der Zellzahl von $239,833 \pm 111,102$ Zellen pro mm^2 an Tag 11 auf $580,083 \pm 368,715$ Zellen pro mm^2 an Tag 15 ermittelt,

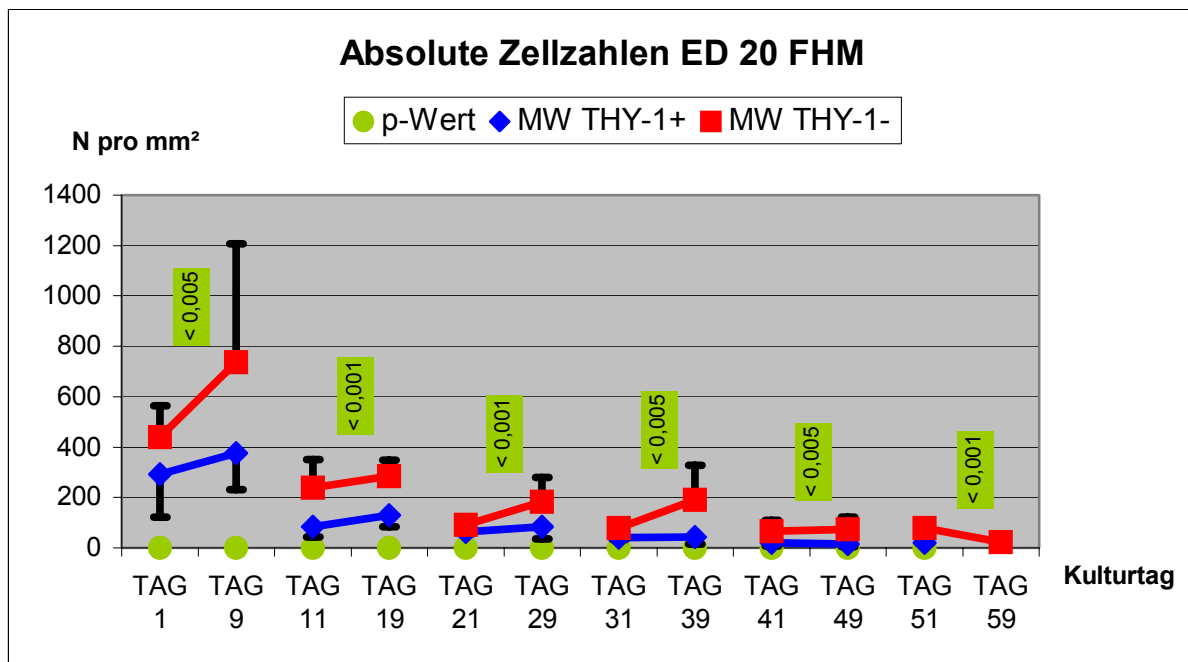
welche sich an Tag 19 auf $284 \pm 63,264$ Zellen pro mm^2 mindert [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,025990324].

Nach der zweiten Zellpassage werden an Tag 21 durchschnittlich $90,889 \pm 8,192$ Zellen pro mm^2 und $201,889 \pm 94,262$ Zellen pro mm^2 an Tag 23 der Kultur festgestellt. An Tag 29 liegt die Zelldichte noch bei $182,889 \pm 96,258$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,019403009].

Nach der dritten Passage wird eine weitere Zellzunahme von $79,222 \pm 24,407$ Zellen pro mm^2 an Tag 31 auf $191,778 \pm 135,24$ Zellen pro mm^2 an Tag 39 der Kultur ermittelt [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,016858936].

In dieser Kultur wird im Anschluss an die vierte Passage noch eine Zellzunahme von $66,667 \pm 42,962$ Zellen pro mm^2 an Tag 41 auf $72,556 \pm 49,313$ Zellen pro mm^2 an Tag 49 festgestellt [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,166681206].

Die Zellzahl vermindert sich folgend drastisch von $79,333 \pm 4,761$ Zellen pro mm^2 an Tag 51 auf $23,333 \pm 2,875$ Zellen pro mm^2 an Kulturtag 59 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 5,31772E-07].



mm ²	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29
MW THY-1+	291,08	375,78	83,9	129,0	62,33	83,67
MW THY-1-	439,42	736,67	239,83	284,0	90,89	182,89
STD THY-1+	169,923	144,188	39,854	46,29	6,576	48,6
STD THY-1-	124,736	469,73	111,102	63,264	8,192	96,258

mm ²	Tag 31	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59
MW THY-1+	40,22	43,44	20,44	15,78	19,5	
MW THY-1-	79,22	191,78	66,67	72,56	79,33	23,33
STD THY-1+	8,438	27,942	11,62	9,68	2,429	
STD THY-1-	24,407	135,24	42,962	49,313	4,761	2,875

Abbildung 4.3: Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der absoluten Zellzahlen pro mm², deren Standardabweichung sowie die p-Werte. Die Graphik zeigt das nach der ersten Passage einmalig signifikant stärkere Zellwachstum der Thy-1-positiven Zellen sowie das ansonsten signifikant stärkere Wachstumspotential der Thy-1-negativen Zellen.

4.1.4 Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM in absoluten Zellzahlen

Auch die Kulturen der an ED 20 isolierten Thy-1-positiven Zellen zeigen unter Kultivierung mit Stem Span Medium bis zur vierten Passage einen Zellzuwachs.

Initial wird eine Zunahme der Zellzahl von $565,333 \pm 270,239$ Zellen pro mm^2 an Tag 1 auf $1249,556 \pm 844,021$ Zellen pro mm^2 an Tag 9 bestimmt [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,007378032].

Nach der ersten Passage liegen an Tag 11 durchschnittlich $296,333 \pm 155,174$ Zellen pro mm^2 vor. Die maximale Zelldichte nach dieser Passage wird an Tag 15 festgestellt und beträgt $727,222 \pm 380,482$ Zellen pro mm^2 . Die Zellzahl reduziert sich bis Tag 19 auf $450,667 \pm 265,364$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,00307405].

Nach der zweiten Zellpassage liegt die Zelldichte bei $395,667 \pm 250,835$ Zellen pro mm^2 an Tag 21. Die maximale Zellzunahme nach dieser zweiten Passage wird mit $630,556 \pm 434,009$ Zellen pro mm^2 an Tag 25 ermittelt. Auch hier ist ein folgender Rückgang auf $428,111 \pm 297,427$ Zellen pro mm^2 an Tag 29 zu verzeichnen [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,081231612].

An Tag 31, nach erfolgreicher dritter Passage der Kultur, liegt eine Zellzahl von $390,778 \pm 279,113$ Zellen pro mm^2 vor. Bis Tag 39 steigt diese auf $529,778 \pm 393,245$ Zellen pro mm^2 an [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,006498592].

Eine Zellzunahme wird nach der folgenden vierten Passage nur noch zu Beginn festgestellt. So zeigt die Kultur an Tag 41 eine Zelldichte von $273,667 \pm 201,736$ Zellen pro mm^2 , $340,556 \pm 252,037$ Zellen pro mm^2 an Tag 43 und an Tag 49 nur noch $140,556 \pm 103,129$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,003789411].

Nach einer letzten Passage sind an Tag 51 noch $177,333 \pm 6,154$ Zellen pro mm^2 , an Tag 59 noch $34,667 \pm 3,141$ Zellen pro mm^2 vorhanden [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 8,00827E-08].

Die an ED 20 isolierten Thy-1-negativen Zellen zeigen unter Kultivierung mit Stem Span Medium ebenfalls ein Zellwachstum.

An Tag 1 der Kultur werden $901,556 \pm 315,315$ Zellen pro mm^2 nachgewiesen. Bis Tag 9 erfolgt eine Zellzunahme auf $1438,556 \pm 863$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,020000493].

Nach der ersten Passage wird eine vorläufig maximale Zellzunahme von $451 \pm 177,165$ Zellen pro mm^2 an Tag 11 auf $865,333 \pm 465,85$ Zellen pro mm^2 an Tag 15 verzeichnet.

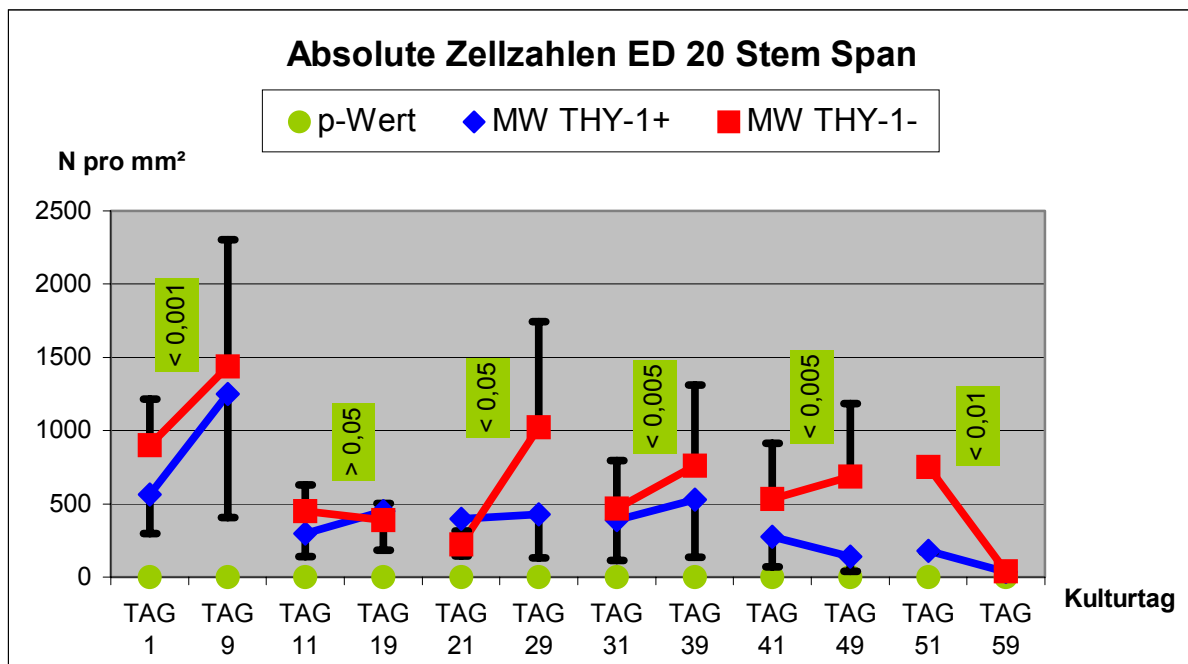
An Tag 19 mindert sich die Zellzahl auf $387 \pm 114,163$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,02425948].

Das absolute Maximum des Zellwachstums wird an Tag 29 der Kultur ermittelt. Liegen an Tag 21 noch $220,889 \pm 95,058$ Zellen pro mm^2 vor, so zeigen sich an Tag 29 $1022 \pm 720,363$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,004990336].

Nach der dritten Passage liegen an Tag 31 $468 \pm 328,267$ Zellen pro mm^2 , an Tag 39 $759,778 \pm 552,886$ Zellen pro mm^2 vor [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,00457955].

Nach vollzogener vierter Passage wird an Tag 41 eine Zelldichte von $533,222 \pm 381,603$ Zellen pro mm^2 ermittelt. An Tag 49 zeigen sich $685 \pm 498,806$ Zellen pro mm^2 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,00490877].

Die Zelldichte reduziert sich nun wesentlich von $752,5 \pm 8,432$ Zellen pro mm^2 an Tag 51 und auf $41 \pm 3,347$ Zellen pro mm^2 an Tag 59 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 4,41781E-11].



mm ²	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29
MW THY-1+	565,33	1249,56	296,33	450,67	395,67	428,11
MW THY-1-	901,56	1438,56	451,0	387,0	220,89	1022,0
STD THY-1+	270,239	844,021	155,174	265,364	250,835	297,427
STD THY-1-	315,315	863,0	177,165	114,163	95,058	720,363

mm ²	Tag 31	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59
MW THY-1+	390,78	529,78	273,67	140,56	177,33	34,67
MW THY-1-	468,0	759,78	533,22	685,0	752,5	41,0
STD THY-1+	279,133	393,245	201,736	103,129	6,154	3,141
STD THY-1-	328,267	552,886	381,603	498,806	8,432	3,347

Abbildung 4.4: Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der absoluten Zellzahlen pro mm², deren Standardabweichung sowie die p-Werte. Die Thy-1-positiven Zellen zeigen nach der initialen Aussiedelung sowie nach der ersten Passage ein stärkeres, z.T. signifikant stärkeres Zellwachstum. Nach der zweiten Passage zeigen die Thy-1-negativen Zellen ein signifikant größeres Wachstumspotential.

4.2 Prozentuales Zellwachstum in Kultur

Die folgenden Graphiken zeigen das prozentuale Wachstumsverhalten der untersuchten Zellkulturen. Das Zellwachstum der kultivierten Zellen wird im Vergleich zu der initial erfolgreich ausgesiedelten bzw. erfolgreich passagierten Zellzahl ermittelt. Die Ursprungsdichte bzw. die Dichte der passagierten Zellen wird dabei gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung und p-Wert. Die Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen das prozentuale Wachstum der mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM kultivierten Zellen. Abbildung 4.5 bezieht sich dabei auf an Schwangerschaftstag 16, Abbildung 4.6 auf an Schwangerschaftstag 20 isolierte Zellen.

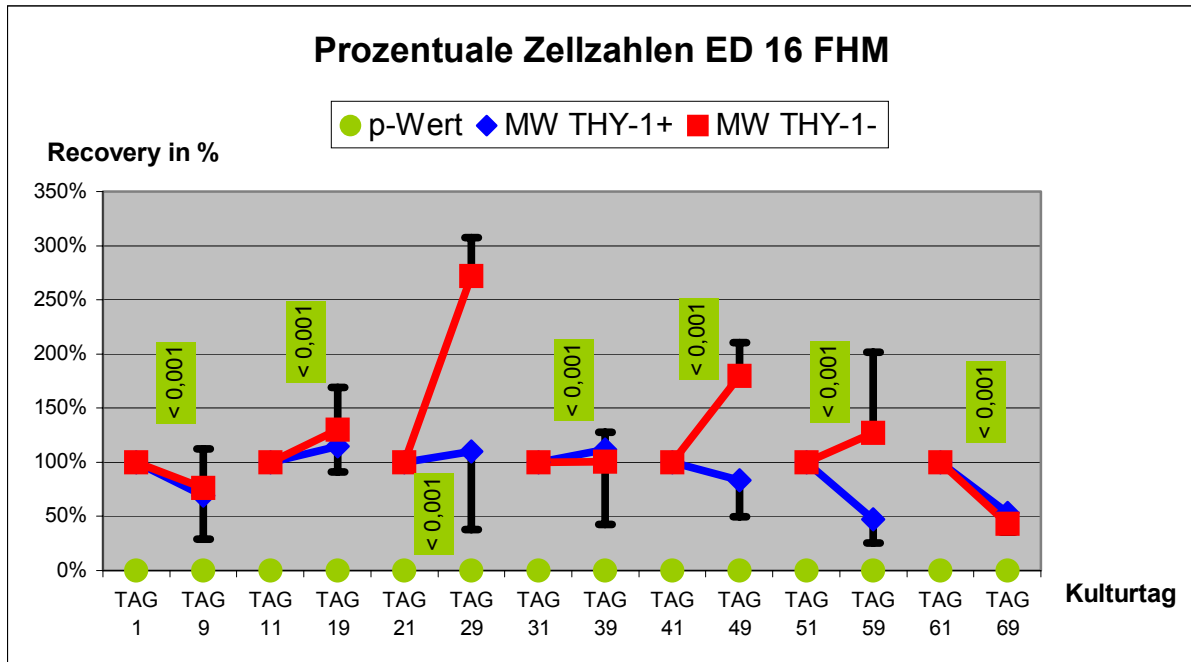
4.2.1 Prozentuales Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM

Die am 16. Schwangerschaftstag isolierten Thy-1-positiven Zellen zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM nach den ersten drei Passagen ein gering ausgeprägtes positives Zellwachstum.

An Tag 3 der Kultur sind $86,7 \% \pm 40,7 \%$ der initial erfolgreich ausgesiedelten Zellen nachweisbar. Dieses Zellrecovery verringert sich kontinuierlich auf $68,9 \% \pm 40,2 \%$ an Tag 9 der Zellkultur [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,001306467]. Nach abgeschlossener erster Passage wird an Tag 13 das vorläufige Zellmaximum von $138,2 \% \pm 16,7 \%$ erreicht. An Tag 19 sind es noch $114,9 \% \pm 23,6 \%$ der mit Erfolg passagierten Zellen [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,131541814]. Nach der zweiten Zellpassage wird an Tag 27 ein maximales Zellrecovery von $135,2 \% \pm 70,7 \%$ verzeichnet. Dieses Recovery geht bis Tag 29 auf $109,9 \% \pm 72,3 \%$ zurück [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,636034723]. An Tag 39 der Zellkultur, nach der dritten Zellpassage, liegt das Zellrecovery bei $111,9 \% \pm 69,5 \%$ und zeigt damit zum letzten Mal in dieser Kultur eine Zunahme [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,288055652]. Im Rahmen der folgenden zwei Passagen verringert sich das Recovery stetig von $83,5 \% \pm 33,9 \%$ an Tag 49 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 4,91816E-05] über $81,0 \% \pm 28,0 \%$ an Tag 53 auf $47,3 \% \pm 21,7 \%$ an Tag 59 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 9,47598E-08]. Nach der sechsten Passage setzt sich dieser Trend fort, so dass an Tag 63 noch $81,8 \% \pm 47,9 \%$, an Tag 69 nur noch $53,1 \% \pm 17,6 \%$ verzeichnet werden [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,000181641].

Die Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM ein ausgeprägteres, auch nach der fünften Zellpassage noch nachweisbares Zellwachstum.

An Tag 5 der Kultur wird ein Zellrecovery von $114,4 \% \pm 36,7 \%$ der mit Erfolg ausgesiedelten Zellen festgestellt. An Tag 9 und vor der ersten Passage sind es noch $76,1 \% \pm 36,3 \%$ [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,000542938]. An Tag 19 wird eine Zunahme des Recovery auf $130,3 \% \pm 38,7 \%$ gezeigt [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,123319656]. Nach nun folgender zweiter Passage erreicht die Zellkultur an Tag 29 mit $271,7 \% \pm 35,8 \%$ ihr Maximum [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 4,19682E-08]. An Tag 39 und nach einer weiteren Passage liegen $100,5 \% \pm 27,3 \%$ der erfolgreich passagierten Zellen vor [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,969948393]. Die sich anschließende vierte Passage ergibt an Tag 49 ein Zellrecovery von $179,6 \% \pm 31,1 \%$ [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 6,3478E-10]. Auch nach beendeter fünfter Passage kann in dieser Zellpopulation ein positives Zellwachstum nachgewiesen werden. An Tag 59 liegen $127,0 \% \pm 74,9 \%$ der Zellen vor [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,01822465]. Sowohl nach der sechsten als auch nach der siebten Passage reduziert sich das Recovery von $87,1 \% \pm 19,0 \%$ an Tag 63 über $42,9 \% \pm 7,3 \%$ an Tag 69 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 7,96393E-08] auf schließlich $61,1 \% \pm 20,9 \%$ an Tag 73.



%	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29	Tag 31
MW THY-1+	1	0,69	1	1,15	1	1,1	1
MW THY-1-	1	0,76	1	1,3	1	2,72	1
STD THY-1+	0	0,402	0	0,236	0	0,723	0
STD THY-1-	0	0,363	0	0,387	0	0,358	0

%	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59	Tag 61	Tag 69
MW THY-1+	1,12	1	0,84	1	0,47	1	0,53
MW THY-1-	1,01	1	1,8	1	1,27	1	0,43
STD THY-1+	0,695	0	0,339	0	0,217	0	0,176
STD THY-1-	0,273	0	0,311	0	0,749	0	0,073

Abbildung 4.5: Graphische und tabellarische Darstellung des prozentualen Zellwachstums der Thy-1-positiven und Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der prozentualen Zellzahlen, deren Standardabweichung sowie die p-Werte. Die Graphik zeigt das signifikant stärkere Zellwachstum der Thy-1-negativen Zellen mit Ausnahmen nach der dritten und der sechsten Zellpassage.

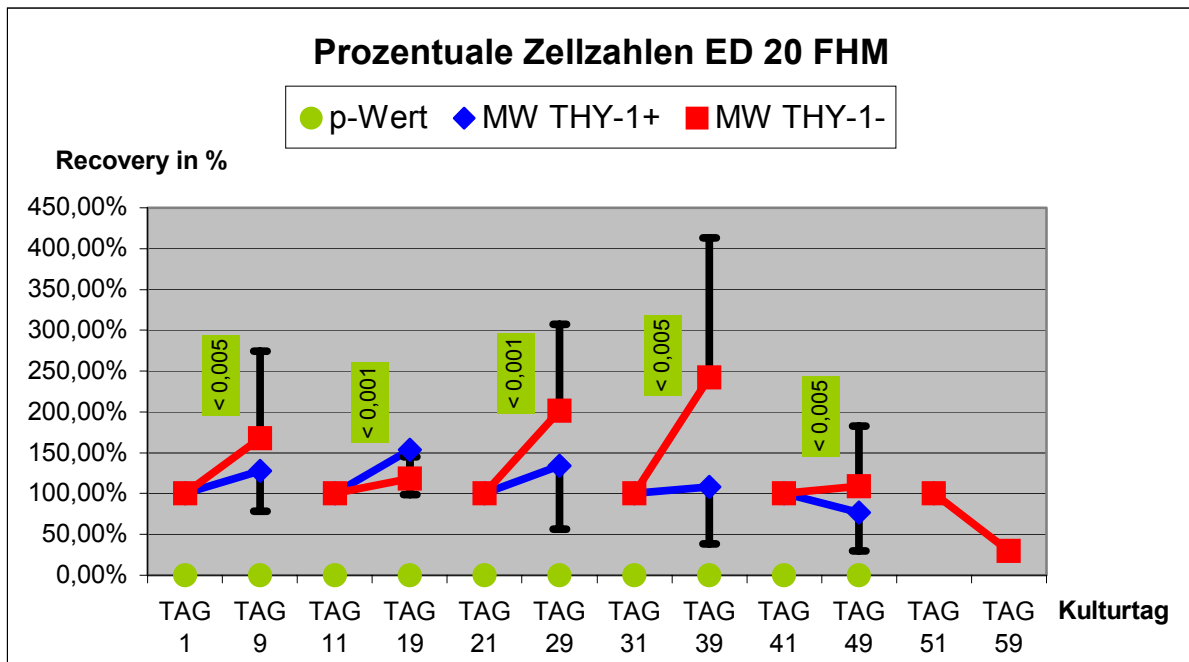
4.2.2 Prozentuales Wachstumsverhalten der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM

Die Thy-1-positiven Zellen des 20. Schwangerschaftstages zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM eine Zellzunahme bis zur vierten Passage.

An Tag 9 der Kultur zeigt sich eine Zunahme des Zellrecovery auf $129,1 \% \pm 49,5 \%$ [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,229147326]. An Tag 15 und nach der ersten Zellpassage wird ein Recovery von $331,0 \% \pm 97,9 \%$ festgestellt. Diese geht bis Kulturtag 19 auf $153,8 \% \pm 55,2 \%$ zurück [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 5,78914E-06]. Nach der zweiten Passage beträgt das maximale Zellrecovery $169,2 \% \pm 90,0 \%$. Dieses wird an Tag 25 der Kultur ermittelt. Das Recovery an Kulturtag 29 liegt bei $134,2 \% \pm 78,0 \%$ [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,225378313]. Vor der vierten Passage, an Kulturtag 39, wird eine Zunahme von $108,0 \% \pm 69,5 \%$ beobachtet [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,673083953]. Nach den folgenden zwei Passagen nimmt das Zellrecovery stetig ab. An Tag 43 werden noch $108,7 \% \pm 59,8 \%$, an Tag 49 noch $77,2 \% \pm 47,3 \%$ [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,072884352] und nach einer weiteren fünften Passage an Tag 55 noch $93,2 \% \pm 11,9 \%$ verzeichnet.

Die Kulturen der Thy-1-negativen Zellen des 20. Gestationstages zeigen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM eine Zunahme des Zellrecovery bis zur fünften Passage.

An Tag 9 der Kultur zeigt sich eine Zunahme des Zellrecovery auf $167,6 \% \pm 106,9 \%$ [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,023022709], wobei mit $200,5 \% \pm 172,8 \%$ das maximale Recovery bereits an Tag 7 beobachtet wird. Nach vollendeter erster Passage wird ein Recovery von $241,9 \% \pm 153,8 \%$ an Tag 15 ermittelt, welches sich bis an Tag 19 auf $118,4 \% \pm 26,4 \%$ reduziert [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,025990324]. Nach der zweiten Zellpassage wird das maximale Recovery von $222,1 \% \pm 103,7 \%$ an Tag 23 der Kultur festgestellt. Es folgt ein Rückgang auf $201,2 \% \pm 105,9 \%$ an Tag 29 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,019403009]. An Tag 39 zeigt sich erneut eine Recoveryzunahme auf $242,1 \% \pm 170,7 \%$ [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,016858936]. Nach Abschluss der vierten Passage liegt das Zellrecovery bei $118,0 \% \pm 79,6 \%$ an Tag 43 bzw. bei $108,8 \% \pm 74,0 \%$ an Tag 49 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 0,166681206]. Es reduziert sich nachfolgend auf $29,4 \% \pm 3,6 \%$ an Kulturtag 59 [p-Wert des zweiseitigen t-Tests: 5,31772E-07].



%	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29
MW THY-1+	1	1,29	1	1,54	1	1,34
MW THY-1-	1	1,68	1	1,18	1	2,01
STD THY-1+	0	0,495	0	0,552	0	0,78
STD THY-1-	0	1,069	0	0,264	0	1,059

%	Tag 31	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59
MW THY-1+	1	1,08	1	0,77		
MW THY-1-	1	2,42	1	1,09	1	0,29
STD THY-1+	0	0,695	0	0,473		
STD THY-1-	0	1,707	0	0,74	0	0,036

Abbildung 4.6: Graphische und tabellarische Darstellung des prozentualen Zellwachstums der Thy-1-positiven und Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der prozentualen Zellzahlen, deren Standardabweichung sowie die p-Werte. Die Graphik zeigt das nach der ersten Passage einmalig signifikant stärkere Zellwachstum der Thy-1-positiven Zellen sowie das ansonsten signifikant stärkere Wachstumspotential der Thy-1-negativen Zellen.

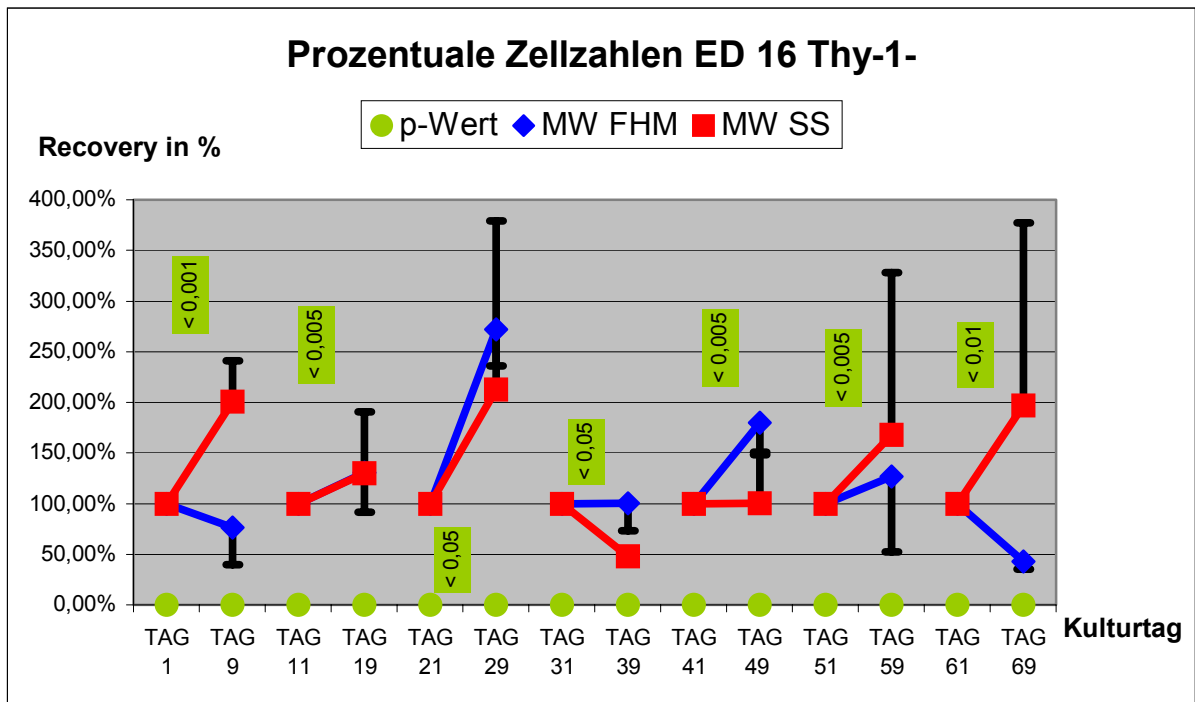
4.3 Zellwachstum unter Einfluss des Kulturmediums

Die an ED 16 isolierten Zellen zeigen unabhängig der Zellart initial unter Kultivierung mit Stem Span und nach der ersten Passage unter FHM-Kultivierung ein signifikant stärkeres Wachstumspotential. Die Thy-1-positiven an ED 20 isolierten Zellen zeigen ein vergleichbares Verhalten.

Die Thy-1-negativen Zellen des 20. Isolationstages weisen nach der initialen Aussiedelung sowie nach der ersten, der dritten und der fünften Passage unter Kultivierung mit FHM und nach der zweiten und vierten Passage unter Kultivierung mit Stem Span ein signifikant höheres Wachstumspotential auf.

Abbildung 4.7 zeigt die graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages in prozentualen Zellzahlen.

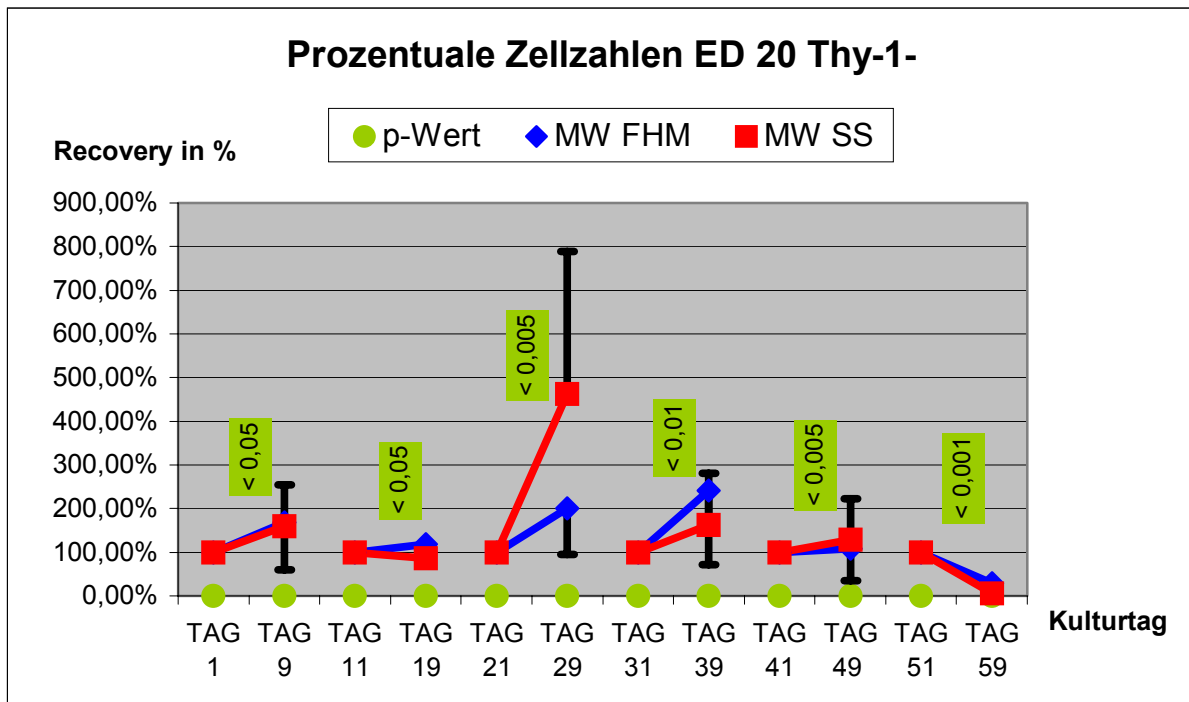
Abbildung 4.8 bezieht sich auf das Zellwachstum der Thy-1-negativen Zellen des 20. Gestationstages und zeigt die graphische und tabellarische Darstellung in prozentualen Zellzahlen.



%	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29	Tag 31
MW FHM	1	0,76	1	1,30	1	2,72	1
MW SS	1	2,01	1	1,3	1	2,12	1
STD FHM	0	0,36	0	0,39	0	0,36	0
STD SS	0	0,4	0	0,61	0	1,67	0

%	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59	Tag 61	Tag 69
MW FHM	1,01	1	1,8	1	1,27	1	0,43
MW SS	0,48	1	1,0	1	1,68	1	1,97
STD FHM	0,27	0	0,31	0	0,75	0	0,07
STD SS	0,06	0	0,5	0	1,6	0	1,81

Abbildung 4.7: Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages in prozentualen Zellzahlen. Initial zeigt sich unter Kultivierung mit Stem Span und nach der ersten Passage unter FHM-Kultivierung ein signifikant stärkeres Zellwachstum. Erst nach der fünften und sechsten Passage zeigt sich das signifikant stärkere Wachstumspotential erneut unter Kultivierung mit Stem Span.



%	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29
MW FHM	1	1,68	1	1,18	1	2,01
MW SS	1	1,6	1	0,86	1	4,63
STD FHM	0	1,07	0	0,26	0	1,06
STD SS	0	0,96	0	0,25	0	3,26

%	Tag 31	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59
MW FHM	1	2,42	1	1,09	1	0,29
MW SS	1	1,62	1	1,29	1	0,06
STD FHM	0	1,71	0	0,74	0	0,04
STD SS	0	1,18	0	0,94	0	0,004

Abbildung 4.8: Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-negativen Zellen des 20. Gestationstages in prozentualen Zellzahlen. Nach der initialen Aussiedelung sowie nach der ersten, der dritten und der fünften Passage zeigt sich unter Kultivierung mit FHM, nach der zweiten und vierten Passage unter Kultivierung mit Stem Span ein signifikant höheres Wachstumspotential.

4.4 Zellwachstum unter Einfluss des Gestationsalters

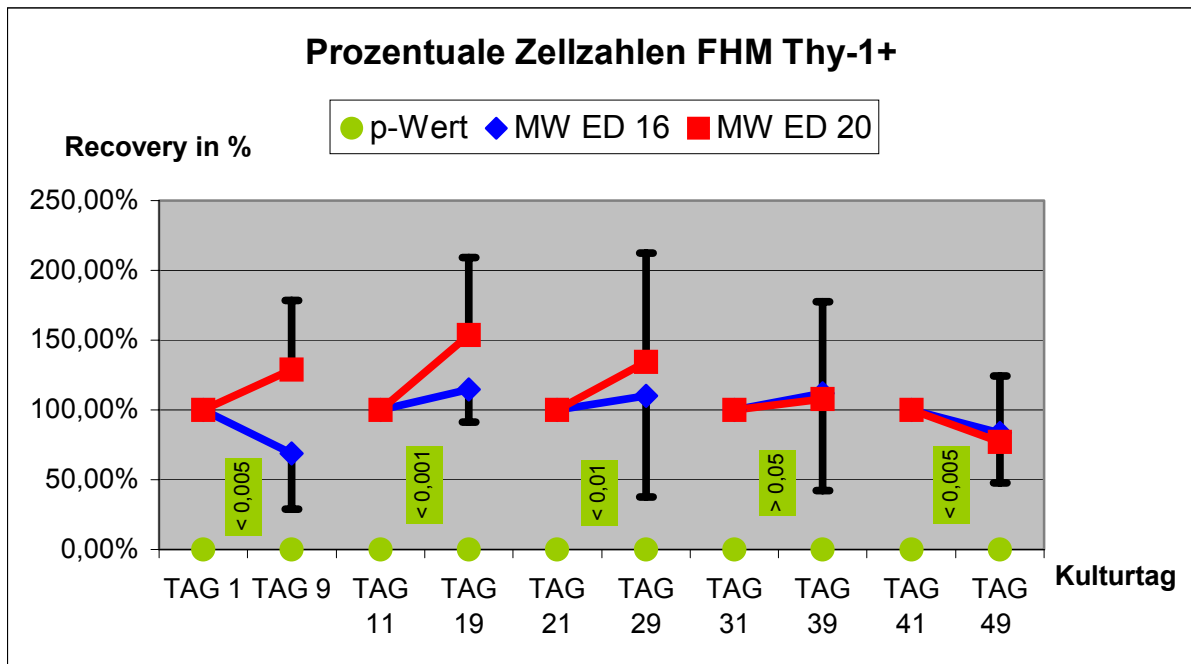
Die an ED 20 isolierten Thy-1-positiven Zellen zeigen bis zur dritten Passage generell ein signifikant stärkeres Zellwachstum als die entsprechenden an ED 16 isolierten Zellen, unabhängig vom Kulturmedium.

Die Thy-1-negativen Zellen zeigen unter Kultivierung mit FHM initial sowie nach der dritten Passage bei Isolation an ED 20, nach der ersten, der zweiten, der vierten und der fünften Passage bei Isolation an ED 16 ein stärkeres, überwiegend signifikant stärkeres Zellwachstum.

Wachstumsunterschiede der mit Stem Span kultivierten Thy-1-negativen Zellen zeigen sich bezüglich des Isolationstages lediglich geringgradig und überwiegend nicht signifikant ausgeprägt. Initial sowie nach der ersten Passage zeigen die Zellen des 16. Gestationstages ein stärkeres Wachstumspotential, nach der zweiten Passage dominiert die Zellzahlzunahme der Thy-1-negativen Zellen von ED 20.

Abbildung 4.9 zeigt die graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in prozentualen Zellzahlen.

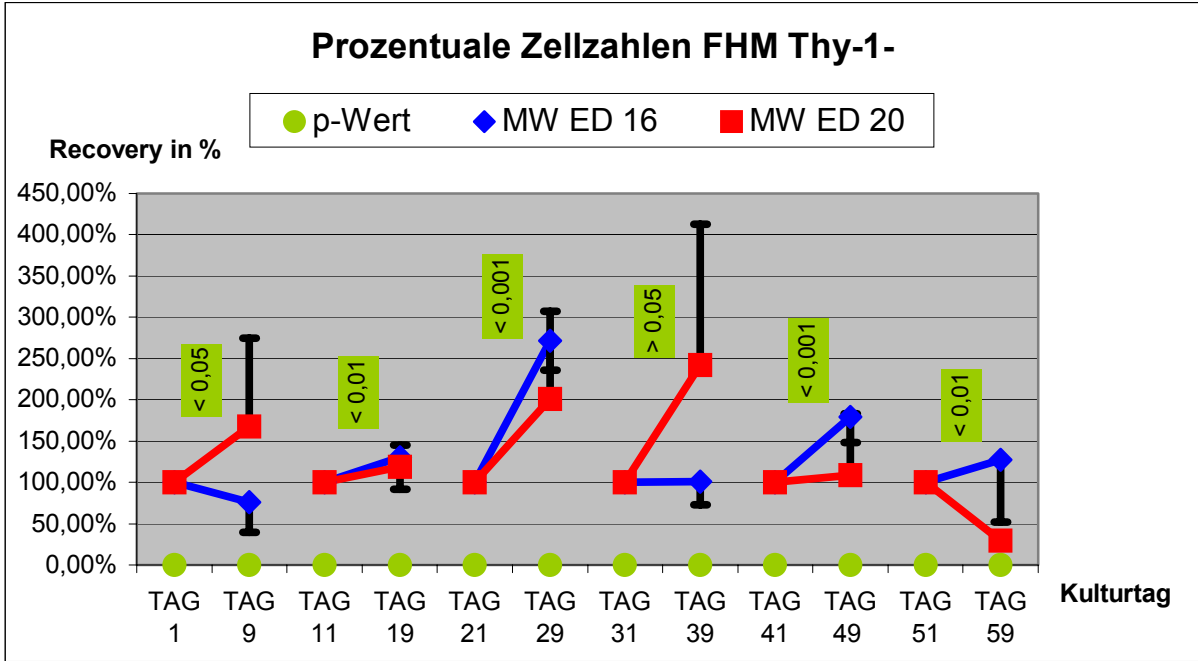
Abbildung 4.10 bezieht sich auf das Zellwachstum der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM und zeigt die graphische und tabellarische Darstellung in prozentualen Zellzahlen.



%	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21
MW ED 16	1	0,69	1	1,15	1
MW ED 20	1	1,29	1	1,54	1
STD ED 16	0	0,4	0	0,24	0
STD ED 20	0	0,5	0	0,55	0

%	Tag 29	Tag 31	Tag 39	Tag 41	Tag 49
MW ED 16	1,01	1	1,12	1	0,84
MW ED 20	1,34	1	1,08	1	0,77
STD ED 16	0,72	0	0,7	0	0,36
STD ED 20	0,78	0	0,7	0	0,47

Abbildung 4.9: Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in prozentualen Zellzahlen. Die Zellen des 20. Gestationstages zeigen nach initialer Aussiedelung sowie nach den ersten beiden Passagen ein signifikant stärkeres Zellwachstum. Nach der dritten und vierten Passage zeigen die Zellen des 16. Schwangerschaftstages ein größeres, zum Teil signifikant größeres Wachstumspotential.



%	Tag 1	Tag 9	Tag 11	Tag 19	Tag 21	Tag 29
MW ED 16	1	0,76	1	1,30	1	2,72
MW ED 20	1	1,68	1	1,18	1	2,01
STD ED 16	0	0,36	0	0,39	0	0,36
STD ED 20	0	1,07	0	0,26	0	1,06

%	Tag 31	Tag 39	Tag 41	Tag 49	Tag 51	Tag 59
MW ED 16	1	1,01	1	1,8	1	1,27
MW ED 20	1	2,42	1	1,09	1	0,29
STD ED 16	0	0,27	0	0,31	0	0,75
STD ED 20	0	1,71	0	0,74	0	0,04

Abbildung 4.10: Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in prozentualen Zellzahlen. Nach initialer Aussiedelung sowie nach der dritten Passage zeigen die Zellen des 20. Gestationstages ein größeres, zum Teil signifikant größeres Zellwachstum. Nach der ersten, der zweiten, der vierten und der fünften Passage zeigen die Zellen des 16. ein signifikant stärkeres Wachstumspotential.

4.5 RT-PCR Analyse der Thy-1-positiven Zellen in Kultur

4.5.1 RT-PCR Analyse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen

Die an ED 16 isolierten Thy-1-positiven Zellen exprimieren zu fast jeder Zeit der Kultur GAPDH. Ein Genausfall unter 25 untersuchten Kulturen bleibt auf einen fortgeschrittenen Kulturtag, Tag 53, begrenzt und wird auf die mangelhafte Qualität der der RNA-Isolation zugrunde liegenden Zellen zurückgeführt. Dieser Ausfall zeigt sich bei mit FHM kultivierten Zellen. Die GAPDH-negative Probe bleibt in der weiteren Beurteilung der Genexpression unberücksichtigt.

An Tag 3 der Kultur exprimieren die Zellen ausnahmslos den Marker Albumin. Am folgenden Isolationstag 13 haben bereits vier der sechs Zellkulturen die Fähigkeit zur Expression dieses Hepatozytenmarkers verloren. Ein Zusammenhang mit dem Kulturmedium ist nicht zu erkennen. Zwei der Albumin-negativen Zellkulturen sind mit FHM, die anderen zwei mit Stem Span Medium kultiviert worden. An Kulturtag 23 haben vier von fünf untersuchten Zellkulturen einen negativen Nachweis für Albumin. Bei nur einer Zellkultur kann eine Albumin-Expression nachgewiesen werden. In diesem Fall sind Rückschlüsse auf die Einflussnahme des Mediums auf diesen Verlauf zulässig, da die Albumin-positiven Zellen durchgehend mit Stem Span Medium kultiviert worden sind. An den Tagen 33, 43, 53 und 63 fällt der Albuminnachweis generell negativ aus.

Die Genexpression des zweiten Hepatozytenmarkers CK-18 zeigt eine ähnliche Entwicklung. Am dritten Tag der Kultur exprimieren alle Thy-1-positiven Zellen diesen Marker. An Kulturtag 13 weisen wiederum vier der sechs untersuchten Zellkulturen einen Verlust der Genexpression auf, wobei auch hier kein Zusammenhang mit dem Kulturmedium zu erkennen ist. Der komplette Ausfall der CK-18-Expression ist bereits an Tag 23 der Kultur zu verzeichnen. An der folgenden Isolationstagen 33, 43, 53 und 63 bleiben die Nachweise für CK-18 negativ.

An Tag 3 der Kultur weisen zwei der drei Zellkulturen eine Expression des Stammzellmarkers Thy-1 auf. Eine Zellkultur ist für diesen Nachweis negativ. Es handelt sich dabei um mit Stem Span Medium kultivierte Zellen. Am dreizehnten Tag liegt nur bei einer der sechs untersuchten Zellkulturen eine negative Thy-1-Expression vor. Diese ist mit FHM kultiviert worden. Auch an Tag 23 und Tag 33 entstammen die Zellen ohne Thy-1-Nachweis ausnahmslos den FHM-Kulturen. An Tag 23 ist eine von fünf, an Tag 33 eine von vier Zellkulturen als negativ zu verzeichnen. An den Tagen 43

und 53 weist je eine der drei untersuchten Zellkulturen, jeweils mit Stem Span kultiviert, einen positiven Nachweis für Thy-1 auf. Auch an Tag 63 ist der positive Thy-1-Nachweis ausnahmslos bei Stem Span Kulturen zu beobachten.

Die Genexpression von AFP kann in allen Zellen an Tag 3 der Kultur nachgewiesen werden. An Isolationstag 13 weisen noch fünf der sechs Zellkulturen diesen positiven Gennachweis auf. Die AFP-negative Zellkultur ist mit FHM kultiviert worden, ein Trend der auch an den folgenden Kulturtagen ersichtlich wird. So haben an Tag 23 drei von fünf Zellkulturen die Fähigkeit zur AFP-Expression verloren, zwei von ihnen sind FHM-Kulturen. An Tag 33 exprimieren zwei der vier Kulturen den Marker AFP. Rückschlüsse auf das verwendete Medium sind dabei nicht zu ziehen. An Tag 43 weist eine der drei Zellkulturen einen positiven AFP-Nachweis auf. Sie hat unter dem Einfluss von Stem Span Medium gestanden. An Tag 53 sind zwei von drei untersuchten Zellkulturen AFP-positiv, wobei die eine mit Stem Span, die andere mit FHM kultiviert worden ist. An Tag 63 weisen die Zellen gänzlich einen negativen AFP-Nachweis auf.

4.5.2 RT-PCR Analyse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen

Die an ED 20 isolierten Thy-1-positiven Zellen exprimieren ohne Ausnahme GAPDH. Die Expression des Hepatozytenmarkers Albumin wird an Kulturtag 3 fast regelhaft nachgewiesen. Nur in einem Einzelfall fällt dieser Nachweis negativ aus. Dieser Ausfall ist unter Kultivierung mit FHM zu verzeichnen. An Tag 13 der Kultur tritt in Bezug auf die Albuminexpression ein gemischtes Bild auf. Bei zwei von vier Zellkulturen wird die Expression von Albumin nachgewiesen. Die Einflussnahme eines Mediums auf diese Entwicklung ist nicht zu erkennen. Sowohl unter Kultivierung mit FHM als auch mit Stem Span Medium treten negative wie positive Nachweise auf. An den Tagen 23, 33, 43 und 53 ist der Albumin-Nachweis ausnahmslos negativ.

Die Expression von CK-18 wird an Kulturtag 3 durchgängig ermittelt. An Tag 13 der Thy-1-positiven Kultur entspricht die Expression von CK-18 der von Albumin. Wiederum sind zwei von vier Nachweisen positiv ohne Rückschlüsse auf Medieneinflüsse zuzulassen. Auch hier ist an den Tagen 23, 33, 43 und 53 der Ausfall der Genexpression festzuhalten.

Der Stammzellmarker Thy-1 wird an Tag 3 von zwei der fünf Zellkulturen exprimiert, wobei der Verlust der Genexpression besonders unter Kultivierung mit FHM festgestellt wird. Sowohl an Tag 13, wie auch an Tag 23 exprimieren zwei von vier Zellkulturen diesen Marker, ohne Rückschlüsse auf die verwendeten Medien zuzulassen. An den

Tagen 33 und 43 zeigen die mit Stem Span kultivierten Zellen ausnahmslos einen positiven Nachweis für die Expression des Stammzellmarkers. An Tag 53 ist der Expressionsnachweis generell negativ.

Die Expression von AFP ist bei den kultivierten Zellen mit geringen Ausnahmen positiv. Eine der sechzehn untersuchten Zellkulturen zeigt im fortgeschrittenen Verlauf der Kultur, an Tag 53, einen Verlust dieser Genexpression. Es sind hierbei die mit Stem Span kultivierten Zellen betroffen.

4.6 RT-PCR Analyse der Thy-1-negativen Zellen in Kultur

4.6.1 RT-PCR Analyse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen

Die RT-PCR Analyse der Thy-1-negativen an ED 16 isolierten Zellen zeigt in 32 untersuchten Zellkulturen durchweg und zu jedem Zeitpunkt der Kultur einen positiven Nachweis für GAPDH.

Dieses kann in Bezug auf die Expression des Hepatozytenmarkers Albumin an Tag 3 sowie an Tag 13 ebenfalls ermittelt werden. An Tag 23 der Kultur tritt der Verlust der Albumin-Expression bei einer der sechs untersuchten Zellkulturen auf. Diese Albumin-negativen Zellen entstammen einer mit Stem Span Medium kultivierten Zellkultur. An Tag 33 weisen nun schon drei von fünf Zellkulturen einen negativen Nachweis für Albumin auf. Dabei dominieren wiederum die unter dem Einfluss von Stem Span Medium stehenden Zellen. An den Kulturtagen 43, 53, 63 und 73 ist der Verlust der Fähigkeit zur Albumin-Expression gänzlich eingetreten.

An den Tagen 3 bis 23 werden durchweg positive Nachweise der Expression des zweiten Hepatozytenmarkers CK-18 erhoben. Zwei der fünf untersuchten Zellkulturen, gänzlich mit Stem Span Medium kultiviert, weisen an Tag 33 einen Verlust dieser Genexpression auf. An Tag 43 verzeichnen bereits vier von fünf Kulturen einen Ausfall der CK-18-Expression. Die CK-18-positive Zellkultur hat unter dem Einfluss von FHM gestanden. An den Tagen 53, 63 und 73 kann insgesamt keine Expression des Hepatozytenmarkers CK-18 mehr nachgewiesen werden.

Ein positiver Nachweis der Expression des Stammzellmarkers Thy-1 kann bei 30 der 32 untersuchten Zellkulturen erzielt werden. Der Ausfall dieser Genexpression beschränkt sich auf fortgeschrittene Kulturstage (je einmalig an Kulturtag 53 bzw. 73) und tritt durchweg in mit Stem Span Medium versorgten Kulturen auf.

Die Genexpression von AFP kann an Tag 3 der Kultur generell nachgewiesen werden. An Tag 13 weisen noch fünf der sechs Zellkulturen einen positiven Nachweis für AFP auf. Die AFP-negativen Zellen entstammen der mit FHM kultivierten Zellpopulation. Auch an Tag 23 können fünf der sechs Zellkulturen als AFP-positiv verzeichnet werden. Die AFP-negativen Zellen haben jedoch nun unter dem Einfluss des Stem Span Mediums gestanden. An Tag 33 haben die Zellen die Fähigkeit zur AFP-Expression in zwei von fünf Kulturen verloren. Unter den AFP-positiven Zellen dominieren die der mit Stem Span Medium versorgten Kulturen. An Tag 43 weisen drei von fünf Zellkulturen einen negativen Nachweis für AFP auf. Die Zellen der Stem Span Population dominieren nun unter den AFP-negativen Zellen. An Tag 53 weist eine der drei Zellkulturen einen negativen AFP-Nachweis auf, wobei es sich auch hier um Stem Span Zellen handelt. An Tag 63 exprimiert eine der verbleibenden zwei Zellkulturen kein AFP mehr. Sowohl die AFP-negative als auch die AFP-positive Kultur war mit Stem Span kultiviert worden. An Tag 73 fällt der AFP-Nachweis gänzlich negativ aus.

4.6.2 RT-PCR Analyse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen

Die an ED 20 isolierten Thy-1-negativen Zellen exprimieren den Zellmarker GAPDH zu jedem Zeitpunkt der Kultur ohne Ausnahme.

Zumindest an Tag 3 der Kultur trifft dieses auch für die Expression des Hepatozytenmarkers Albumin zu. An Tag 13 wird schon bei zwei der fünf Zellkulturen ein Ausfall dieser Genexpression verzeichnet. Diese Albumin-negativen Zellen haben sämtlich unter dem Einfluss von FHM gestanden. An dem folgenden Isolationstag 23 liegt bei zwei von vier untersuchten Zellkulturen ein negativer Albuminnachweis vor. Ein Zusammenhang mit dem Kulturmedium kann dabei nicht ermittelt werden. Sowohl die mit FHM als auch die mit Stem Span Medium versorgten Zellkulturen bringen Albumin-negative Zellen hervor. An den Isolationstagen 33, 43 und 53 haben die Zellen die Fähigkeit zur Albumin-Expression gänzlich verloren.

Die Expression des zweiten Hepatozytenmarkers CK-18 kann nicht nur an Tag 3, sondern auch an Tag 13 durchgängig nachgewiesen werden. Erst an Tag 23 ist bei zwei der vier Zellkulturen ein Verlust dieser Genexpression zu verzeichnen. Zusammenhänge zu dem versorgenden Medium sind dabei nicht zu erkennen. An den folgenden Tagen 33, 43 und 53 ist auch hier kein Nachweis der CK-18-Expression mehr möglich.

Der Stammzellmarker Thy-1 wird vergleichbar mit GAPDH zu jedem Zeitpunkt der Kultur ausnahmslos exprimiert. Diese Aussage kann auch für die Expression von AFP gemacht werden.

4.7 Auswertung der RT-PCR Analyse in tabellarischer Form

Die folgenden Tabellen zeigen die Auswertung der RT-PCR Ergebnisse. Die Markerexpression zweier Zellpopulationen werden einander gegenübergestellt. Jeweils ein Kulturkriterium variiert hierbei. In den Tabellen 4.11 bis 4.14 werden die verschiedenen Zellarten in Bezug auf ihre Markerexpression miteinander verglichen. In den Tabellen 4.15 bis 4.18 sind die unterschiedlichen Kulturmedien, in den Tabellen 4.19 bis 4.22 die verschiedenen Isolationstage das variierende Kriterium.

4.7.1 RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM

	ED 16 FHM				Thy-1- vs Thy-1+			
	Thy-1-				Thy-1+			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	++	++	++	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 13	+++	+++	+++	+ - +	- + -	- + +	- + -	+ - +
	+	+	+	+	-	+	-	+
Tag 23	+++	+++	+++	+++	--	- +	--	--
	+	+	+	+	-		-	-
Tag 33	+ -	++	++	+ -	--	- +	--	+ -
		+	+		-		-	
Tag 43	--	++	+ -	+ -	-	-	-	-
	-	+			-	-	-	-
Tag 53	-	+	-	+	_*	_*	_*	+*
	-	+	-	+				

Tabelle 4.11: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall. Die mit dem Sternchen markierten Zeichen können bei negativem GAPDH-Nachweis dieser Zellgruppe zu diesem Kulturzeitpunkt nicht für die Auswertung verwendet werden.

4.7.2 RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM

	ED 16		SS		Thy-1- vs Thy-1+			
	Thy-1-				Thy-1+			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	++	++	++	++	+-	++	++
	+	+	+	+	+		+	+
Tag 13	+++	+++	+++	+++	+-	+++	+-	+++
	+	+	+	+	-	+	-	+
Tag 23	++-	+++	+++	+-	+-	+++	---	+-
	+	+	+	+	-	+	-	+
Tag 33	+-	+++	+-	+-	--	++	--	+-
	-	+	-	+	-	+	-	
Tag 43	---	+++	---	--	--	-	--	+-
	-	+	-	-	-		-	
Tag 53	--	-	--	-	--	-	--	+-
	-		-		-		-	
Tag 63	--	++	--	-	-	+	-	-
	-	+	-		-	+	-	-
Tag 73	-	-	-	-				
	-	-	-	-				

Tabelle 4.12: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.3 RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM

	ED 20		FHM		Thy-1- vs Thy-1+			
	Thy-1-				Thy-1+			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++
	+	+	+	+	+	-	+	+
Tag 13	-	+++	+++	+++	+	+	+	++
	-	+	+	+				+
Tag 23	+-	++	+-	++	--	+-	--	++
		+		+	-		-	+

Tabelle 4.13: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.4 RT-PCR Tabelle der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM

	ED20		SS		Thy-1- vs Thy-1+			
	Thy-1-				Thy-1+			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	++	++	++	++	+-	++	++
	+	+	+	+	+		+	+
Tag 13	++	++	++	++	+-	+-	+-	++
	+	+	+	+				+
Tag 23	+-	++	+-	++	--	+-	--	++
		+		+	-		-	+
Tag 33	-	+	-	+	-	+	-	+
	-	+	-	+	-	+	-	+
Tag 43	-	+	-	+	-	+	-	+
	-	+	-	+	-	+	-	+
Tag 53	-	+	-	+	-	-	-	-
	-	+	-	+	-	-	-	-

Tabelle 4.14: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.5 RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen

	Thy-1+		ED 16		SS vs FHM			
	SS				FHM			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	+-	++	++	+	+	+	+
	+		+	+	+	+	+	+
Tag 13	+- -	+++	+- -	+++	- + -	- + +	- + -	+ - +
	-	+	-	+	-	+	-	+
Tag 23	+- -	+++	- - -	+ - +	--	- +	--	--
	-	+	-	+	-		-	-
Tag 33	--	++	--	+ -	--	- +	--	+ -
	-	+	-		-		-	
Tag 43	--	- +	--	+ -	-	-	-	-
	-		-		-	-	-	-
Tag 53	--	- +	--	+ -	_*	_*	_*	+*
	-		-					
Tag 63	-	+	-	-				
	-	+	-	-				

Tabelle 4.15: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall. Die mit dem Sternchen markierten Zeichen können bei negativem GAPDH-Nachweis dieser Zellgruppe zu diesem Kulturzeitpunkt nicht für die Auswertung verwendet werden.

4.7.6 RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen

Thy-1- ED 16 SS vs FHM								
	SS				FHM			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	++	++	++	++	++	++	++
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 23	++-	+++	+++	+ - +	+++	+++	+++	+++
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 33	+ - -	+++	+ - -	+ - +	+ -	++	++	+ -
	-	+	-	+		+	+	
Tag 43	- - -	+++	- - -	- - +	- -	++	+ -	+ -
	-	+	-	-	-	+		
Tag 53	- -	- +	- -	- +	-	+	-	+
	-		-		-	+	-	+
Tag 63	- -	++	- -	- +				
	-	+	-					
Tag 73	-	-	-	-				
	-	-	-	-				

Tabelle 4.16: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.7 RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen

Thy-1+ ED 20 SS vs FHM								
	SS				FHM			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	+ -	++	++	- + +	- + -	+++	+++
	+		+	+	+	-	+	+
Tag 13	+ -	+ -	+ -	++	+ -	+ -	+ -	++
				+				+
Tag 23	- -	+ -	- -	++	- -	+ -	- -	++
	-		-	+	-		-	+
Tag 33	-	+	-	+				
	-	+	-	+				
Tag 43	-	+	-	+				
	-	+	-	+				
Tag 53	-	-	-	-				
	-	-	-	-				

Tabelle 4.17: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.8 RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen

	Thy-1- ED 20				SS vs FHM			
	SS				FHM			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 13	++	++	++	++	- + -	+++	+++	+++
	+	+	+	+	-	+	+	+
Tag 23	+ -	++	+ -	++	+ -	++	+ -	++
		+		+		+		+
Tag 33	-	+	-	+				
	-	+	-	+				
Tag 43	-	+	-	+				
	-	+	-	+				
Tag 53	-	+	-	+				
	-	+	-	+				

Tabelle 4.18: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.9 RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM

	Thy-1+ FHM ED 16				ED 16 vs ED 20			
	ED 16				ED 20			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	+	+	+	+	+ - +	- + -	+++	+++
	+	+	+	+	+	-	+	+
Tag 13	+ - -	- + +	- + -	+ - +	+ -	+ -	+ -	++
	-	+	-	+				+
Tag 23	- -	- +	- -	- -	- -	+ -	- -	++
	-		-	-	-		-	+
Tag 33	- -	- +	- -	+ -				
	-		-					
Tag 43	-	-	-	-				
	-	-	-	-				
Tag 53	-*	-*	-*	+				

Tabelle 4.19: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall. Die mit dem Sternchen markierten Zeichen können bei negativem GAPDH-Nachweis dieser Zellgruppe zu diesem Kulturzeitpunkt nicht für die Auswertung verwendet werden.

4.7.10 RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM

Thy-1- FHM ED 16 vs ED 20								
	ED 16				ED 20			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 13	+++	+++	+++	+ - +	+ - -	+++	+++	+++
	+	+	+	+	-	+	+	+
Tag 23	+++	+++	+++	+++	+ -	++	+ -	++
	+	+	+	+		+		+
Tag 33	- +	++	++	+ -				
		+	+					
Tag 43	- -	++	+ -	+ -				
	-	+						
Tag 53	-	+	-	+				
	-	+	-	+				

Tabelle 4.20: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.11 RT-PCR Tabelle der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM

Thy-1+ SS ED 16 vs ED 20								
	ED 16				ED 20			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	+ -	++	++	++	+ -	++	++
	+		+	+	+		+	+
Tag 13	+ - -	+++	+ - -	+++	+ -	+ -	+ -	++
	-	+	-	+				+
Tag 23	+ - -	+++	- - -	+ - +	- -	+ -	- -	++
	-	+	-	+	-		-	+
Tag 33	- -	++	- -	+ -	-	+	-	+
	-	+	-		-	+	-	+
Tag 43	- -	- +	- -	+ -	-	+	-	+
	-		-		-	+	-	+
Tag 53	- -	- +	- -	+ -	-	-	-	-
	-		-		-	-	-	-
Tag 63	-	+	-	-				
	-	+	-	-				

Tabelle 4.21: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.7.12 RT-PCR Tabelle der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM

	Thy-1-		SS	ED 16 vs ED 20				
	ED 16				ED 20			
	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP	Albumin	Thy-1	CK-18	AFP
Tag 3	++	++	++	++	++	++	++	++
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 13	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
	+	+	+	+	+	+	+	+
Tag 23	++-	+++	+++	+ - +	+ -	++	+ -	++
	+	+	+	+		+		+
Tag 33	+ - -	+++	+ - -	+ - +	-	+	-	+
	-	+	-	+	-	+	-	+
Tag 43	- - -	+++	- - -	- - +	-	+	-	+
	-	+	-	-	-	+	-	+
Tag 53	- -	- +	- -	- +	-	+	-	+
	-		-		-	+	-	+
Tag 63	- -	++	- -	- +				
	-	+	-					
Tag 73	-	-	-	-				
	-	-	-	-				

Tabelle 4.22: Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM. Das Plus steht für einen positiven Markernachweis, das Minus für einen Expressionsausfall.

4.8 Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen

Die Thy-1-negativen Zellen zeigen gegenüber den Thy-1-positiven bezüglich der Zelldifferenzierung in Richtung leberspezifische Zellpopulation einen Differenzierungsvorteil, unabhängig von Kulturmedium und Isolationstag. Die Expression der leberspezifischen Gene Albumin, CK-18 und AFP kann sowohl über einen längeren Kulturzeitraum als auch in einer höheren Anzahl der untersuchten Kulturen nachgewiesen werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Differenzierungsvorteil der Thy-1-negativen Zellen bezüglich der Zelldifferenzierung in Richtung leberspezifische Zellpopulation. Die Abbildungen 4.23 bis 4.25 zeigen die Albumin-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur. Die Abbildungen 4.26 und 4.27 stellen die CK-18-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur dar. Die Abbildung 4.28 bezieht sich auf die Albumin-Expression einer an Gestationstag 20 isolierten Zellkultur.



Abbildung 4.23: Albumin-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahl 13 für den dritten Tag nach der ersten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

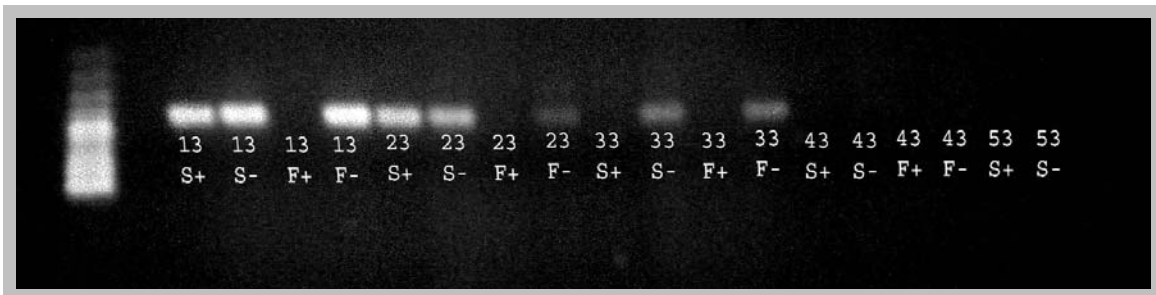


Abbildung 4.24: Albumin-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahlen 13, 23, 33, 43 und 53 stehen jeweils für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten oder fünften Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.



Abbildung 4.25: Albumin-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahl 13 für den dritten Tag nach der ersten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

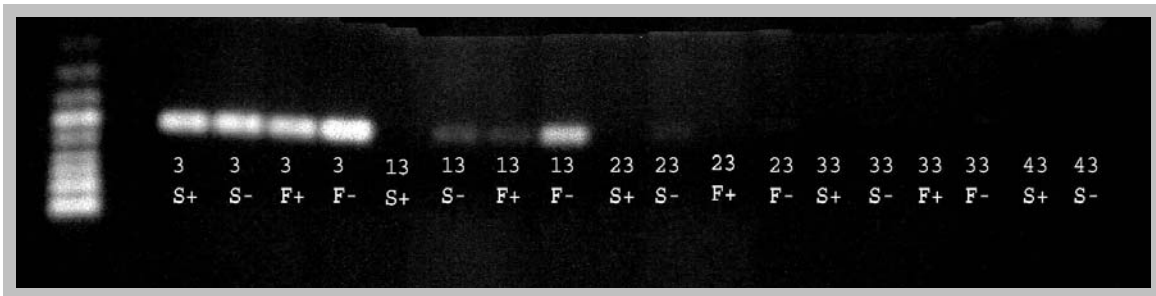


Abbildung 4.26: CK-18-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33 und 43 stehen jeweils für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten oder vierten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.



Abbildung 4.27: CK-18-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33, 43, 53 und 63 stehen jeweils für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften oder sechsten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

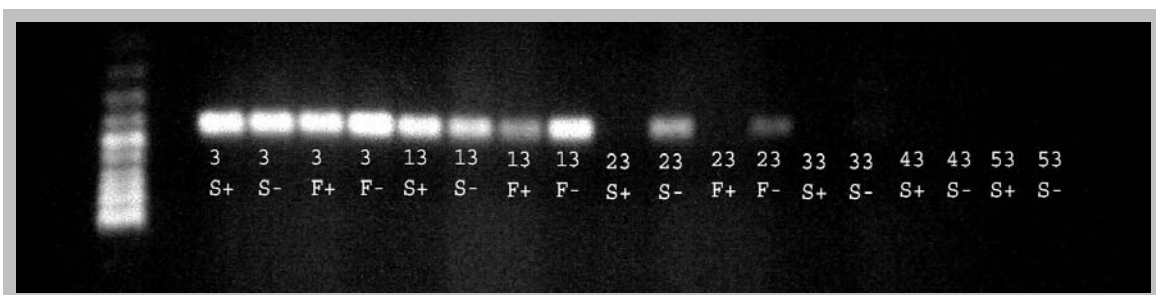


Abbildung 4.28: Albumin-Expression einer an Gestationstag 20 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33, 43 und 53 stehen jeweils für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten oder fünften Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

4.9 Differenzierung unter Einfluss des Kulturmediums

Die mit Stem Span kultivierten Zellen zeigen gegenüber der FHM-Zellpopulation ein stärkeres Differenzierungspotential. Die an ED 20 isolierten Zellen sind unter Kultivierung mit Stem Span über einen längeren Kulturzeitraum zur leberspezifischen Differenzierung fähig, unabhängig der Zellart. Die Thy-1-positiven Zellen des 16. Gestationstages zeigen unter Kultivierung mit Stem Span, verglichen mit entsprechenden FHM-Kulturen, die Expression der leberspezifischen Gene sowohl über einen längeren Kulturzeitraum als auch in einer höheren Anzahl der untersuchten Kulturen. Bei den Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages lassen die Differenzierungsunterschiede durch Medieneinflüsse keine eindeutigen Rückschlüsse zu.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Differenzierungsvorteil der mit Stem Span kultivierten Zellpopulationen bezüglich der Zelldifferenzierung in Richtung leberspezifische Zellkultur. Abbildung 4.29 zeigt die AFP-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten, Abbildung 4.30 die AFP-Expression einer an Gestationstag 20 isolierten Zellkultur.

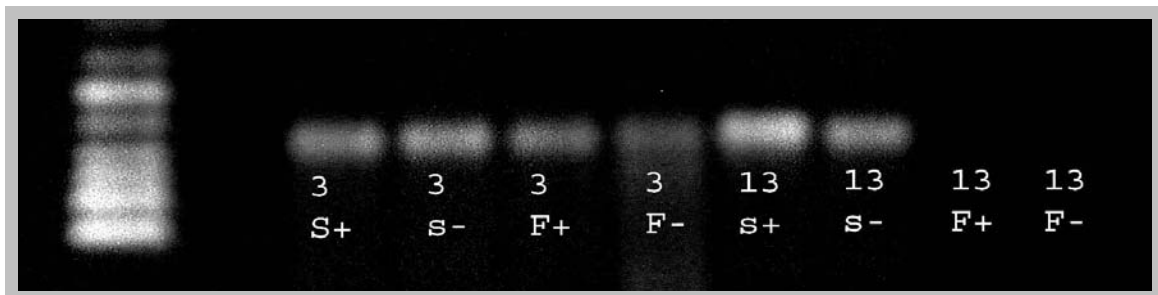


Abbildung 4.29: AFP-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahl 13 für den dritten Tag nach der ersten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

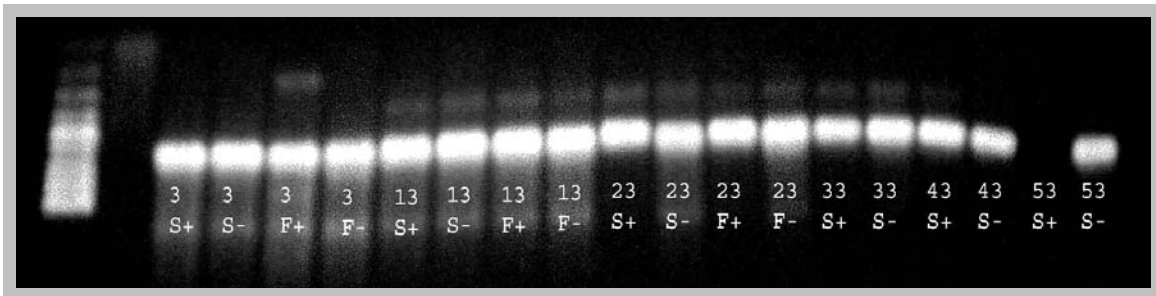


Abbildung 4.30: AFP-Expression einer an Gestationstag 20 isolierten Zellkultur. Die erste Position von links zeigt den DNA-Gen-Ruler, die zweite die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33, 43 und 53 stehen für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten oder fünften Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

4.10 Differenzierung unter Einfluss des Gestationsalters

Die an ED 16 isolierten Zellen zeigen gegenüber den Zellen des 20. Gestationstages einen Vorteil bezogen auf die leberspezifische Differenzierung. Die Expression der leberspezifischen Gene Albumin, CK-18 und AFP kann sowohl über einen längeren Kulturzeitraum als auch in einer höheren Anzahl der untersuchten Kulturen nachgewiesen werden. Die Thy-1-positiven Zellen weisen diesen Trend, besonders unter Kultivierung mit FHM, nur in mäßiger Ausprägung auf.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Differenzierungsvorteil der an Gestationstag 16 isolierten Zellen (A) gegenüber den an Gestationstag 20 isolierten Zellen (B). Die Abbildungen 4.31 bis 4.34 stellen die AFP-Expression dar. Die Abbildungen 4.35 bis 4.37 beziehen sich auf die Expression von Albumin. Die Abbildungen 4.38 und 4.39 zeigen die Expression von CK-18. Abbildung 4.31 zeigt den Differenzierungsvorteil der an Gestationstag 16 isolierten Zellen gegenüber den an Gestationstag 20 isolierten Zellen sowohl für die Thy-1-positiven Zellen einer mit Stem Span kultivierten Zellpopulation als auch für die Thy-1-negativen Zellen einer FHM-Kultur. Abbildung 4.32 stellt diesen Differenzierungsvorteil für die Thy-1-negative Zellpopulation einer mit Stem Span versorgten Zellkultur dar. Abbildung 4.33 bezieht sich sowohl auf die Thy-1-negativen Zellen einer mit FHM kultivierten Zellpopulation als auch auf die Zellen beider Zellart einer Stem Span-Kultur. Abbildung 4.34 zeigt die stärker ausgeprägte Differenzierung der Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages einer mit Stem Span kultivierten Zellpopulation. Abbildungen 4.35 und 4.36 zeigen den oben genannten Differenzierungsvorteil sowohl für die Thy-1-negativen Zellen einer mit FHM kultivierten Zellpopulation als auch für die Zellen beider Zellart einer Stem Span-

Kultur. Abbildung 4.37 bezieht sich auf die Zellen beider Zellart einer FHM-Kultur, Abbildung 4.38 auf die Thy-1-negativen Zellen einer FHM-Kultur. Abbildung 4.39 zeigt die Thy-1-negativen Zellen beider Zellkulturarten.

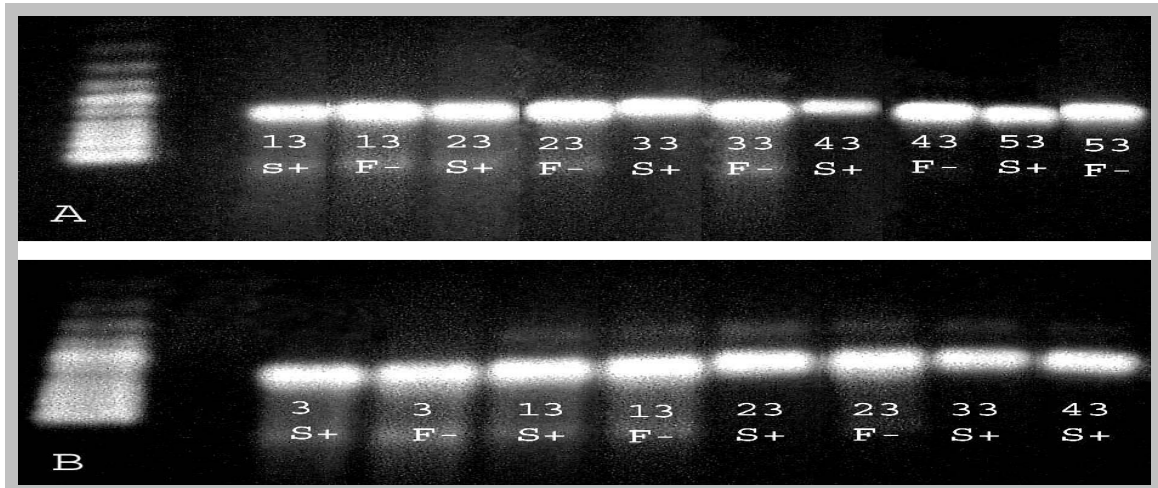


Abbildung 4.31: AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33, 43 und 53 stehen für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten oder fünften Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

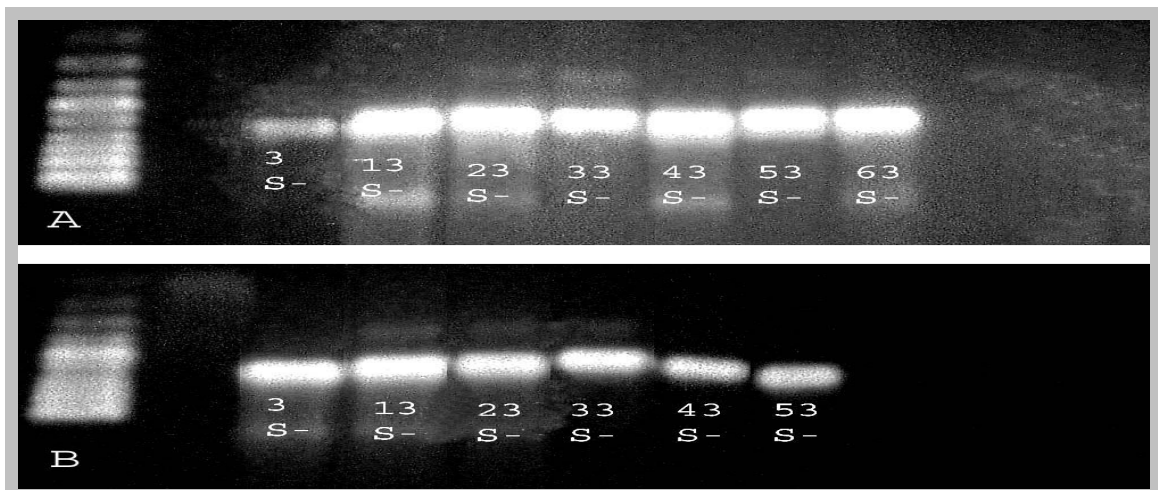


Abbildung 4.32: AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33, 43, 53 und 63 stehen für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften oder sechsten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM. Das Minus steht für die Thy-1-negativen Zellen.

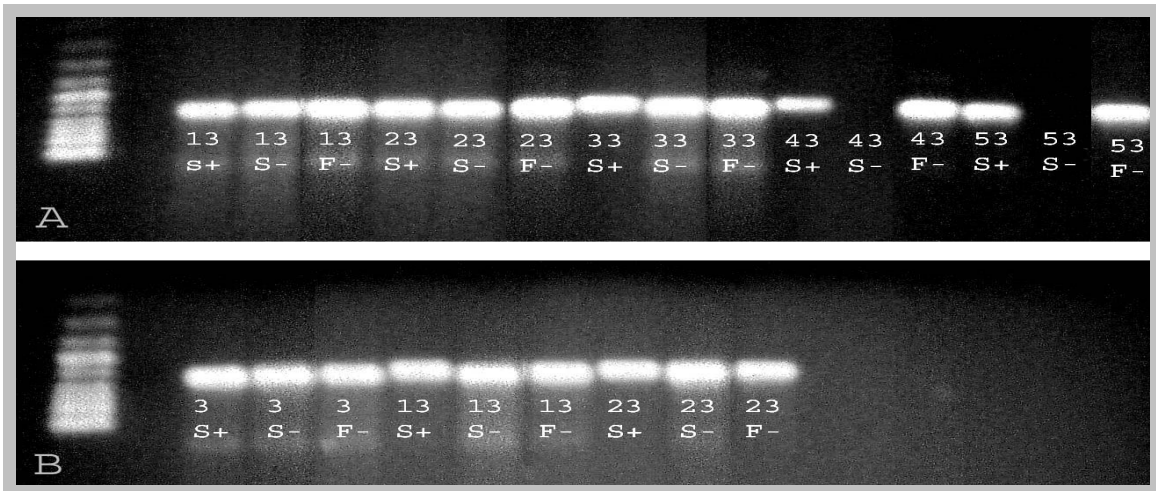


Abbildung 4.33: AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33, 43 und 53 stehen für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten oder fünften Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

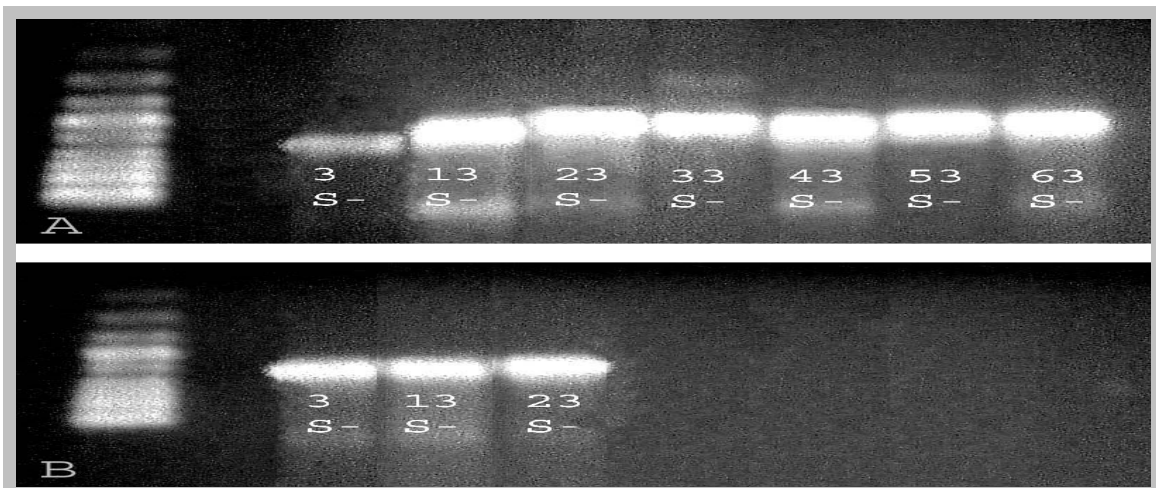


Abbildung 4.34: AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33, 43, 53 und 63 stehen für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften oder sechsten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

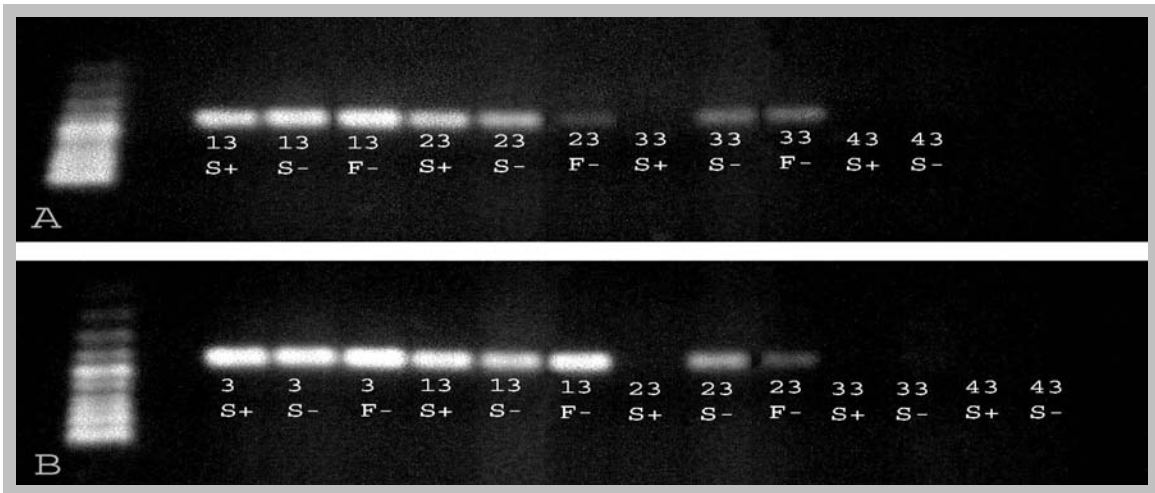


Abbildung 4.35: Albumin-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33 und 43 stehen für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten oder vierten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

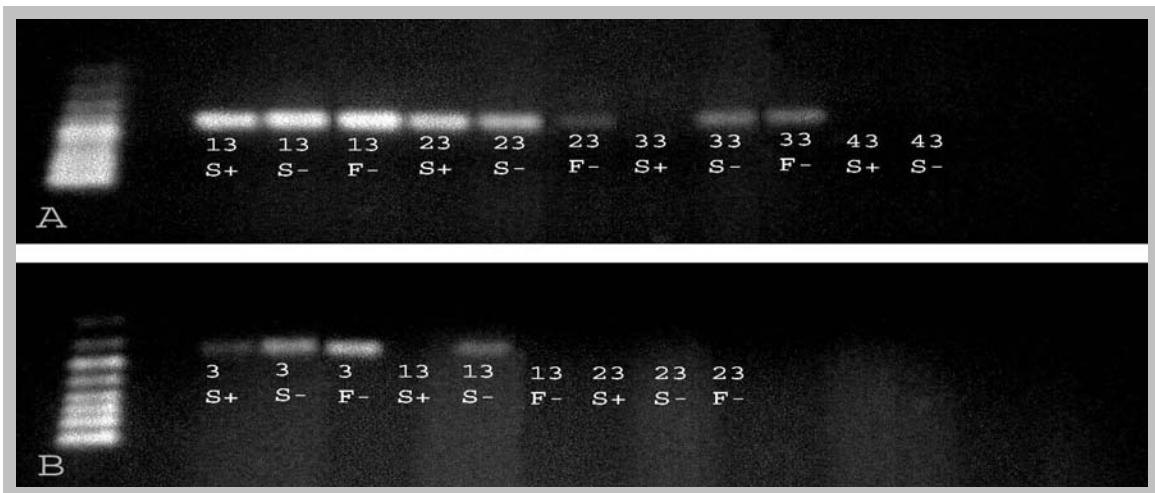


Abbildung 4.36: Albumin-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13, 23, 33 und 43 stehen für den dritten Tag nach der ersten, zweiten, dritten oder vierten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

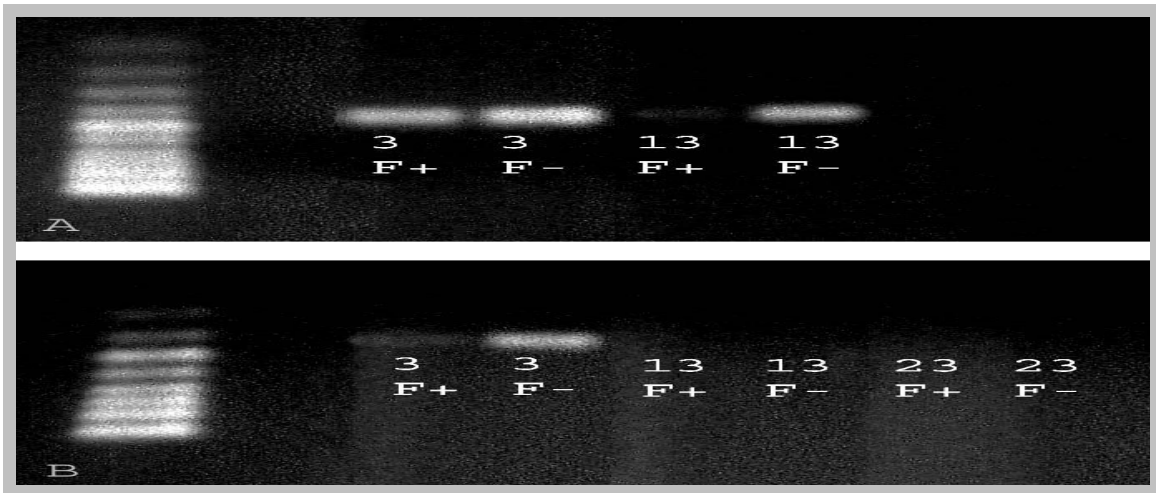


Abbildung 4.37: Albumin-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13 und 23 stehen für den dritten Tag nach der ersten bzw. zweiten Zellpassage. Das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Plus steht für Thy-1-positive, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

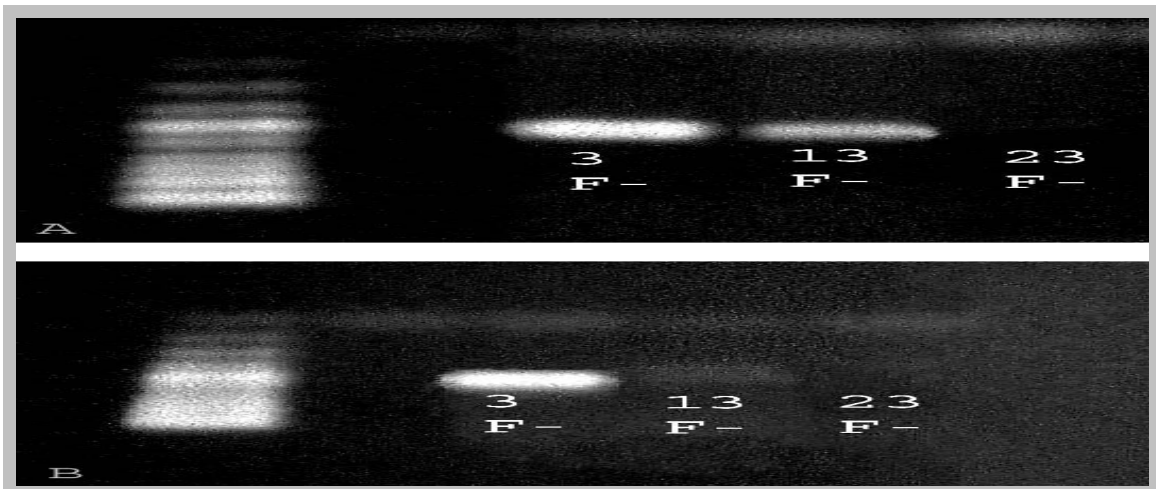


Abbildung 4.38: CK-18-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13 und 23 stehen für den dritten Tag nach der ersten bzw. zweiten Zellpassage. Das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM, das Minus für Thy-1-negative Zellen.

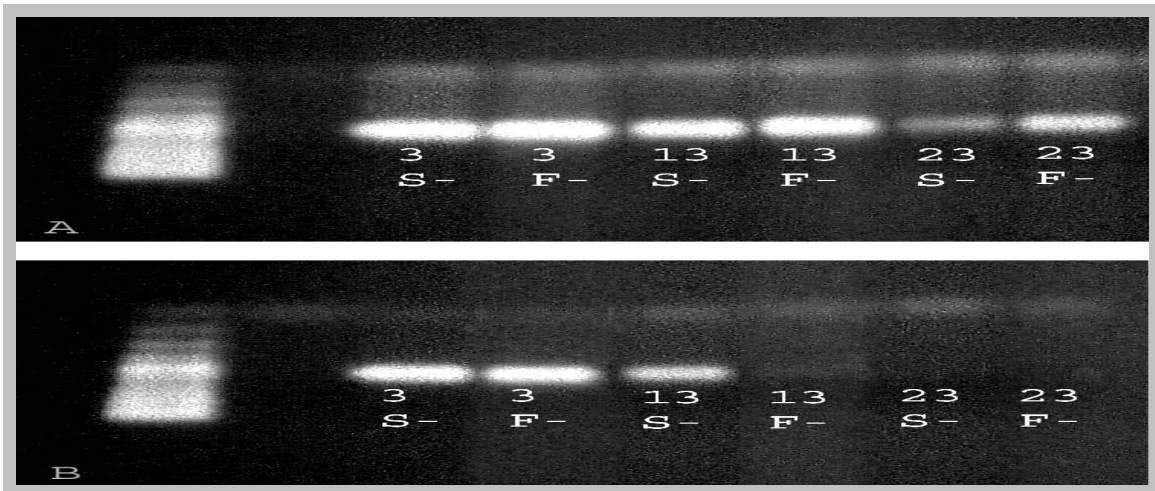


Abbildung 4.39: CK-18-Expression unter Einfluss des Isolationstages. Die erste Position von links zeigt jeweils den DNA-Gen-Ruler, die zweite jeweils die H₂O-negativ Kontrolle. Die Zahl 3 steht für den dritten Kulturtag nach initialer Zellaussiedelung, die Zahlen 13 und 23 stehen für den dritten Tag nach der ersten bzw. zweiten Zellpassage. Das S steht für das Stammzellmedium Stem Span SFEM, das F für das Fetale Hepatozyten Medium FHM. Das Minus steht für die Thy-1-negativen Zellen.

4.11 Immuncytochemische Analyse

Die immuncytochemische Analyse der Zellen erfolgt mittels Nachweis der Proteinexpression von Albumin, α -Fetoprotein, CD 34, Cytokeratin-18, OX 43 und OX 44.

Folgende Abbildung zeigen die Proteinexpression in exemplarischer Form. Die Abbildung 4.40 zeigt Aufnahmen von Objektträgerkulturen, die Abbildungen 4.41 und 4.42 zeigen Aufnahmen von Cytospins. Die Abbildung 4.40 zeigt den Verlauf der immuncytochemischen Auswertung des Leberzellmarkers Cytokeratin-18 einer Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten Zellkultur des 16. Schwangerschaftstages. Die Abbildung 4.41 bezieht sich auf die an Tag 10 der Zellkultur erfolgte immuncytochemische Auswertung der Leberzellmarker einer Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten Zellkultur des 16. Schwangerschaftstages. Die Abbildung 4.42 zeigt die an Tag 10 der Zellkultur erfolgte immuncytochemische Auswertung des Leberzellmarkers Albumin aller vier Zellpopulationen einer an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellkultur.

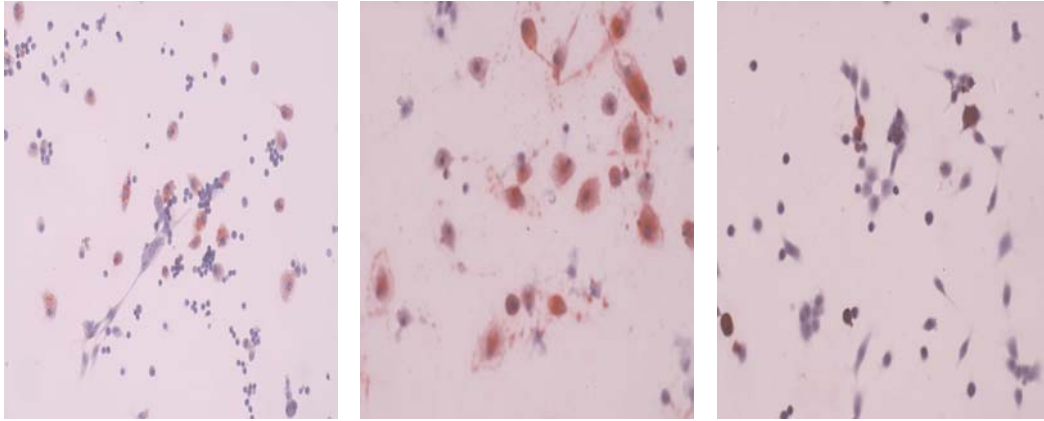


Abbildung 4.40: Von links nach rechts: An Kulturtag 3, 23 und 33 erfolgte immuncytochemische Auswertung des Leberzellmarkers Cytokeratin-18 einer Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten Zellkultur des 16. Schwangerschaftstages.

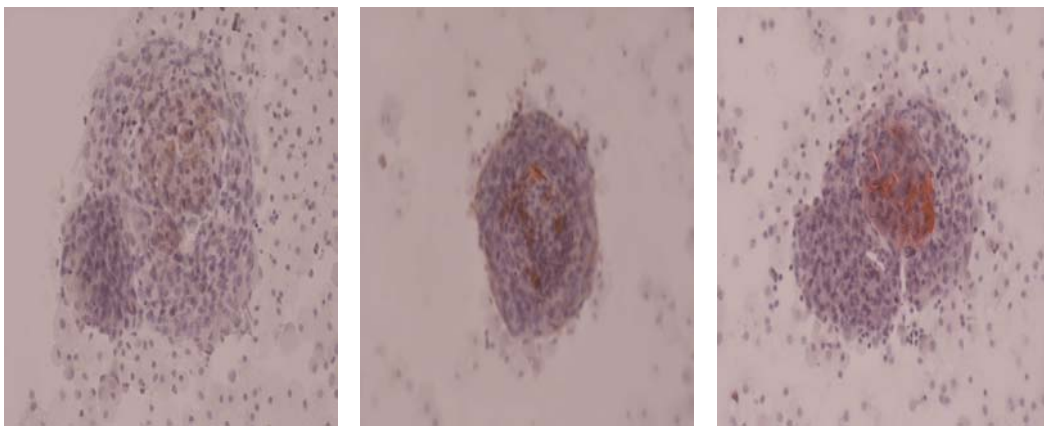


Abbildung 4.41: Von links nach rechts: An Tag 10 der Zellkultur erfolgte immuncytochemische Auswertung der Leberzellmarker α -Fetoprotein, Albumin und Cytokeratin-18 einer Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten Zellkultur des 16. Schwangerschaftstages.

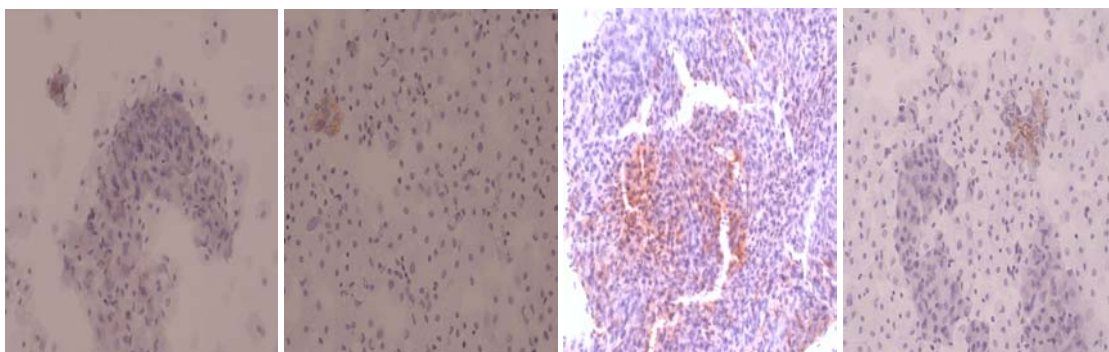


Abbildung 4.42: Von links nach rechts: An Tag 10 der Zellkultur erfolgte immuncytochemische Auswertung des Leberzellmarkers Albumin einer Thy-1-positiven mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM versorgten, einer Thy-1-negativen mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM versorgten, einer Thy-1-positiven mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten und einer Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten Zellpopulation einer an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellkultur.

5 Diskussion

5.1 Wachstum der Zellen in Kultur

5.1.1 Wachstum der unterschiedlichen Zelltypen

Sowohl die Thy-1-positiven als auch die Thy-1-negativen Zellen zeigen potentiell die Fähigkeit der Zellteilung in Kultur und damit eine Vermehrung der Zellzahl in vitro.

Die Thy-1-negativen Zellen zeigen unabhängig von Kulturmedium und Isolationstag eine Zunahme der Zellzahl. Unter Kultivierung mit FHM zeigen die Thy-1-positiven Zellen des 16. Schwangerschaftstages ein gering ausgeprägtes Zellwachstum. Die Thy-1-positiven am 20. Schwangerschaftstag isolierten Zellen zeigen - ähnlich den Thy-1-negativen Zellen - eine Zunahme der Zellzahl unabhängig vom Kulturmedium.

Das Wachstumspotential der Thy-1-negativen Zellen übersteigt in der Regel das der Thy-1-positiven Zellen, besonders ersichtlich bei Isolation an Gestationstag 16 und unter Kultivierung mit FHM.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu bedenken, dass vor allem die Thy-1-negativ sortierten Zellen aufgrund des Isolationsverfahrens mit Zellen des hämatopoetischen Systems überlagert sein könnten. Es konnte gezeigt werden, dass nach dem Vorgang des Magnetic Cell Sorting (MACS) eine Restkontamination von etwa 0,6 % hämatopoetischer Zellen verbleibt [39]. Zusätzlich scheint die Leber in der Fetalperiode maßgeblich an der Blutbildung beteiligt [53]. In früheren Tierexperimenten wurde der Beginn der hepatische Hämatopoese der Ratte um den 17. Schwangerschaftstag dokumentiert [54]. Es ist daher nahe liegend, dass die Methode des Magnetic Cell Sortings (MACS) zu den ausgewählten Zeitpunkten der Isolation bei steigendem Anteil hämatopoetischer Zellen am Primärisolat möglicherweise nicht sämtliche Zellen des hämatopoetischen Systems eliminieren kann. Deswegen können sich diese besonders in der Zellpopulation der Thy-1-negativen Zellen anhäufen. Die Isolation der Thy-1-positiven Zellen durch ein Positiv-Sorting mittels MACS könnte eine geringere Kontamination dieser Zellen mit hämatopoetischen Zellen erklären. Dieses wäre eine mögliche Begründung für das beobachtete höhere Wachstumspotential der Thy-1-negativen Zellpopulation.

Es ist vorstellbar, dass die Zellen des hämatopoetischen Systems einen Selektionsvorteil gegenüber den hepatischen Zellen aufweisen und daher besonders zum Ende der Kulturperiode hin den überwiegenden Anteil der Zellen darstellen. Bereits eine geringgradige Kontamination der Zellkulturen mit expansiv wachsenden Zellen könnte

zu Überwucherungsphänomenen führen. Dieser Überwucherungseffekt könnte durch die Zellpassagierung im Sinne einer Selektion zusätzlich verstärkt werden.

Des Weiteren ist die Wahl des Passagezeitpunktes zu überdenken. Bei den Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM liegt die maximale Zellzahl generell zum Zeitpunkt der Zellpassage vor, so dass der Passagezeitpunkt als geeignet erscheint. Diese Aussage ist auch für die Thy-1-negativen Zellen des 20. Schwangerschaftstages unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM zu treffen. Sowohl bei den Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM als auch bei den Thy-1-negativen Zellen des 20. Schwangerschaftstages unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM findet das maximale Zellwachstum jedoch bereits in den Kulturtagen vor der Zellpassage statt. Die Zellzahl hat sich bis zum Passagezeitpunkt bereits wieder reduziert. Es ist zu erwägen, die Zellpassage in diesen Zellpopulationen zur optimalen Ausnutzung des Zellwachstums auf einen früheren Kulturtag zu verlegen.

Die Aussiedelung der Zellen erfolgt initial sowie nach Zellpassage standardisiert mit je 250.000 Zellen pro Well. Sowohl die Thy-1-positiven als auch die Thy-1-negativen Zellen zeigen unabhängig von Kulturmedium und Isolationstag mit zunehmender Anzahl an Zellpassagen eine Abnahme des anwachsenden Zellanteils. Dies deutet darauf hin, dass ein steigender Anteil der Zellen unter Kultivierung und Passagierung die Fähigkeit in Kultur anzuwachsen verliert. Die Zellen scheinen mit Fortschreiten der Zellpassagen ihre Kultivierbarkeit zu reduzieren. Eine Reifung der Zellen in Kultur stellt hierfür eine mögliche Erklärung dar.

5.1.2 Wachstum unter Einfluss des Kulturmediums

Die Daten deuten generell auf ein besseres initiales Anwachsen der Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM sowie auf ein stärkeres Zellwachstum nach der ersten Passage unter FHM-Kultivierung hin.

So zeigen die an ED 16 isolierten Zellen unabhängig der Zellart zu Beginn der Zellkultur unter Kultivierung mit Stem Span ein stärkeres Zellwachstum. Nach der ersten Passage dominiert das Wachstumsverhalten der mit FHM versorgten Kulturen. Dies lässt darauf schließen, dass die noch unreifen Zellen früher Isolationstage zu Beginn der Kultur einen höheren Bedarf an Wachstumsfaktoren aufweisen, um sich in Kultur teilen zu können. In früheren Arbeiten konnte der Einfluss der im Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Zellproliferation gezeigt werden [55]. So wurde

zum Beispiel ein positiver Effekt des Hepatozyten Wachstumsfaktors HGF auf das Zellwachstum hepatischer Zellen in Kultur nachgewiesen [56-60]. In vivo zeigt dieser Wachstumsfaktor eine wichtige Bedeutung im Rahmen regenerativer Leberprozesse [61-64]. Auch in Bezug auf die hepatische Differenzierung zeigt der Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF einen Einfluss. Knochenmarkszellen zeigen unter Zugabe von HGF eine gesteigerte Differenzierung zu hepatischen Zelllinien [65-69]. Das initial bessere Anwachsen der Zellen könnte also auf den im Stammzellmedium enthaltenen Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF zurückzuführen sein. Dieser Wachstumsfaktor ist im fetalen Hepatozyten Medium FHM nicht enthalten.

Das potente Wachstum der an ED 16 isolierten Zellen nach der ersten Zellpassage unter FHM könnte als Hinweis auf eine Reifung bzw. Differenzierung der Zellen zu Hepatozyten gedeutet werden.

Die geringen Unterschiede im Wachstumsverhalten von Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellen des 16. Schwangerschaftstages könnten erneut auf das Vorliegen von Mischpopulationen hinweisen.

Die Thy-1-positiven an ED 20 isolierten Zellen zeigen - verglichen mit den Zellen des 16. Gestationstages - ein ähnliches Verhalten. Da das Stammzellmedium Stem Span SFEM direkt auf die Bedürfnisse der Thy-1-positiven potentiellen Stammzellen ausgerichtet ist, erscheint es als verständlich, dass die Kultur der Thy-1-positiven Zellen unter diesen Kulturbedingungen initial günstiger verläuft. Der Umschwung von besserem Zellwachstum unter dem Stammzellmedium Stem Span SFEM zu besserem Zellwachstum unter Fetalem Hepatozyten Medium FHM könnte erneut als Hinweis auf eine Reifung bzw. Differenzierung der Zellen zu Hepatozyten gedeutet werden. Es ist auch denkbar, dass die Thy-1-positiven Zellen im Verlauf der Kulturperiode den erhöhten Bedarf an Wachstumsfaktoren verlieren oder es sich erneut um ein Phänomen ausgehend von dem Vorliegen von Mischpopulationen handelt.

Die Thy-1-negativen Zellen des 20. Isolationstages weisen initial sowie nach der ersten Passage unter Kultivierung mit FHM und nach der zweiten Passage unter Kultivierung mit Stem Span ein signifikant höheres Wachstumspotential auf. Dieses Ergebnis bekräftigt die Vermutung, dass es sich bei den Thy-1-negativen Zellen um Vorläufer der Hepatozyten handelt. Der Umschwung des bevorzugten Mediums könnte auf eine zu Beginn der Kultur gering ausgeprägte, im Kulturverlauf ansteigende Verunreinigung der Thy-1-negativen Zellen mit Thy-1-positiven Zellen zurückzuführen sein.

5.1.3 Wachstum unter Einfluss des Gestationsalters

Die Thy-1-positiven Zellen zeigen unabhängig vom Kulturmedium nach Isolation an Schwangerschaftstag 20 ein stärkeres Zellwachstum als die entsprechenden an ED 16 isolierten Zellen. Dieses könnte auf den höheren Anteil Thy-1-positiver Zellen an den Zellisolaten des 20. Schwangerschaftstages zurückzuführen sein. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Gesamtzellzahl des Primärisolates von ED 16 zu ED 22 zunimmt [39, 40], sondern auch der Anteil Thy-1-positiver Zellen am Primärisolat von $3,5 \% \pm 0,6 \%$ an Schwangerschaftstag 16 auf $18,5 \% \pm 1,5 \%$ an Schwangerschaftstag 22 ansteigt [39]. Die Aussiedelungsdichte der verschiedenen Zelltypen erfolgt zwar angepasst, jeweils 250.000 Zellen pro Well, jedoch steigert ein höherer Anteil der gewünschten Zellen am Primärisolat die Wahrscheinlichkeit der Reinheit der ausgesiedelten Zellen. Die stärkere Wachstumstendenz der Thy-1-positiven Zellen des 20. Gestationstages könnte damit in den besseren Kulturbedingungen bei höherer Dichte der gewünschten Zellen begründet sein.

Die Thy-1-negativen mit FHM kultivierten Zellen zeigen nach der initialen Aussiedelung ebenfalls nach Isolation an ED 20 ein signifikant stärkeres Zellwachstum. Es ist anzunehmen, dass der zunehmende Grad der Zellreife für das anfänglich bessere Anwachsen der Zellen in Kultur verantwortlich ist. Auch hier könnte der höhere Anteil der gewünschten Zellen am Primärisolat einen positiven Einfluss zeigen. Diese Thy-1-negativen mit FHM kultivierten Zellen zeigen im weiteren Verlauf der Kultur jedoch bei Isolation an ED 16 ein signifikant stärkeres Zellwachstum. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass bei zunehmender Zellreife fetaler Leberzellen die Teilungsfähigkeit der Zellen abnimmt [70]. Gruppusso et al. zeigten in einer ihrer Arbeiten den Zusammenhang von Wachstum und Differenzierung fetaler Hepatozyten. Im Vergleich von Zellen des 19. mit Zellen des 21. Gestationsages zeigte sich ein höherer BrdU-Markierungsindex der an Schwangerschaftstag 19 isolierten Zellen [70]. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein höherer Differenzierungsgrad der Zellen mit einem geringeren Wachstumspotential verknüpft zu sein scheint und spricht für eine Reifung der untersuchten Zellen zum Ende der Fetalperiode. Die Thy-1-negativen Zellen scheinen sich während der Fetalzeit von unreifen fetalen Zellen mit hohem Wachstumspotential zu reifen Hepatozyten mit vergleichsweise geringem Wachstum zu entwickeln. Das Wachstumsverhalten der Thy-1-negativen mit FHM kultivierten Zellen nähert sich somit im Verlauf der Leberentwicklung dem bekannten Wachstumsverhalten adulter Hepatozyten an. Die

adulten Hepatozyten zeigten in früheren Studien annähernd gleich bleibende Zellzahlen über einen Kulturzeitraum von 14 Tagen mit einer leichten Abnahme der Zellzahl in der zweiten Kulturhälfte [42]. Dieses Ergebnis bekräftigt erneut die Vermutung, dass es sich bei den Thy-1-negativen Zellen um Vorläufer der adulten Hepatozyten handelt.

Auch die Untersuchung der mit Stem Span kultivierten Thy-1-negativen Zellen erhärtet diesen Verdacht. Diese Zellen zeigen nach initialer Aussiedelung sowie nach der ersten Passage nach Isolation am 16. Gestationstag ein stärkeres Wachstumspotential und verdeutlichen die Abnahme der Teilungsfähigkeit bei zunehmender Zellreife.

Generell zeigen die Thy-1-negativen Zellen ein stärker ausgeprägtes Zellwachstum nach Isolation an Schwangerschaftstag 16.

5.2 Differenzierung der Zellen in Kultur

5.2.1 Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen

Die beiden untersuchten Zellarten (Thy-1-positive potentielle fetale Leberstammzellen und Thy-1-negative potentielle fetale Leberprogenitoren) zeigen zu Beginn der Zellkultur die Expression der leberspezifischen Marker Albumin, Cytokeratin-18 und α -Fetoprotein. Unabhängig von Kulturmedium und Isolationstag exprimieren die Thy-1-negativen Zellen diese leberspezifischen Gene über einen längeren Kulturzeitraum. Dieses zeigt einen Differenzierungsvorteil der Thy-1-negativen Zellen in Richtung leberspezifische Zellpopulation und lässt darauf schließen, dass es sich bei den Thy-1-negativen Zellen um die Vorläufer der Hepatozyten handelt.

Die Thy-1-positiven Zellen zeigen im Verlauf der Kulturperiode eine weniger konstante Expression der leberspezifischen Marker, welches auf eine geringer stabile Differenzierungsleistung der Zellen schließen lässt. Dies könnte bedeuten, dass die Thy-1-positiven Zellen Vorläufer unreifer Zellen der adulten Leber mit potentiell stammzellartigen Eigenschaften darstellen.

Da die Thy-1-negativ sortierten Zellen vor allem zum Ende der Passage die Expression des Stammzellmarkers Thy-1 aufweisen, ist auch hier hinsichtlich der Differenzierungsfähigkeit der Zellen die Aussage aufgrund von Überwucherungsphänomenen limitiert. Die Methode der Zelltrennung mittels Magnetic Cell Sorting (MACS) scheint einen gewissen Anteil an unsortierten Zellen zurück zu lassen, welcher im Verlauf einer Expansion in Kultur zu einer Vermischung der Zellpopulationen führt.

5.2.2 Differenzierung unter Einfluss des Kulturmediums

In früheren Arbeiten konnte der Einfluss des Kulturmediums mit den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren auf Zelldifferenzierung und Genexpression gezeigt werden [56, 59, 60, 71-83]. Generell zeigen die mit Stem Span kultivierten Zellen gegenüber den FHM-Zellpopulationen ein stabileres leberspezifisches Differenzierungspotential. Die Expression der leberspezifischen Marker Albumin, Cytokeratin-18 und α -Fetoprotein erfolgt sowohl über mehrere Passagen als auch konstanter in den einzelnen Kulturen. Dieses Ergebnis zeigt, dass Stem Span für die Differenzierung der Zellen geeigneter erscheint. Für den im Stem Span Medium enthaltenen Hepatozyten Wachstumsfaktor HGF konnte auch in früheren Studien ein positiver Einfluss auf die Genexpression hepatischer Zellen gezeigt werden [56, 58, 59, 84].

5.2.3 Differenzierung unter Einfluss des Gestationsalters

Die an ED 16 isolierten Zellen exprimieren die leberspezifischen Marker Albumin, Cytokeratin-18 und α -Fetoprotein sowohl über einen längeren Kulturzeitraum als auch in einer höheren Anzahl der untersuchten Kulturen und zeigen somit gegenüber den Zellen des 20. Gestationstages einen Differenzierungsvorteil. Es scheint, dass undifferenzierte Zellen früher Isolationstage ein konstanteres Differenzierungspotential in Richtung hepatische Zelllinien aufweisen. Vergleichbare Trends zeigten sich bereits in vorausgegangenen Studien [42]. Es ist zu vermuten, dass ein höherer Grad an Kontamination der hepatischen Zellen mit nicht-hepatischen Zellen der Isolate fortgeschrittener Schwangerschaftstage zu diesem Ergebnis beiträgt. Bei den Thy-1-positiven Zellen könnte der zunehmende Grad der Entdifferenzierung im Verlauf der Leberentwicklung mit einer Abnahme der Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen in Bezug auf die leberspezifische Differenzierung einhergehen.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Sowohl die Thy-1-negativen als auch die Thy-1-positiven Zellen zeigen in Kultur ein von dem der adulten Hepatozyten abweichendes Wachstumsverhalten. Während die adulten Hepatozyten in früheren Arbeiten annähernd konstante Zellzahlen mit abnehmender Tendenz in der zweiten Hälfte der 14-tägigen Kulturperiode verzeichneten, zeigen die fetalen Leberzellen ein starkes Zellwachstum auf bis zu 500 % der initial ausgesiedelten bzw. erfolgreich passagierten Zellen. Das Wachstum

der Thy-1-negativen Zellen übersteigt dabei generell das Wachstumspotential der Thy-1-positiven Zellen.

Die fetalen Zellen exprimieren zu Beginn der Passagen die leberspezifischen Marker Albumin, Cytokeratin-18 und α -Fetoprotein ohne Ausnahme, wobei besonders die Thy-1-negativen Zellen ihr hepatisches Differenzierungspotential über mehrere Passagen stabil beibehalten. Generell zeigen sich eine anhaltende AFP-Expression sowie eine Abnahme der Expression von Albumin und Cytokeratin-18 in den höheren Passagen.

Im Vergleich der untersuchten Kulturmedien zeigt sich, die gesamte Kulturperiode betrachtend, eine stärkere Zellproliferation unter Verwendung des Fetalen Hepatozyten Mediums FHM. Der initial höhere Kulturerfolg sowie die stärker ausgeprägte leberspezifische Differenzierung werden jedoch unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM ermittelt.

Während die Thy-1-positiven Zellen ein stärkeres Wachstumspotential nach Isolation an Schwangerschaftstag 20 aufweisen, zeigen die Thy-1-negativen Zellen nach Isolation am 16. Gestationstag ein überlegenes Zellwachstum. Die beständigere Expression der leberspezifischen Marker und damit die Beibehaltung der leberspezifischen Differenzierung wurden ebenfalls bei Zellen des 16. Schwangerschaftstages festgestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich sowohl bei den Thy-1-negativen als auch bei den Thy-1-positiven Zellen um fetale Vorläuferzellen der adulten Leber handelt. Beide Zelltypen sind passagierbar und können sich in Kultur vermehren. Eine leberspezifische Differenzierung kann über mehrere Passagen erreicht werden.

7 Fazit der Arbeit

7.1 Beurteilung der Ergebnisse

In der adulten Leber konnten hepatische Stammzellen nachgewiesen und ihr Markerprofil analysiert werden [8, 14]. Sie exprimieren die von den Blutstammzellen bekannten Marker Thy-1, CD 34 und c-kit [39].

Als einziger Progenitor der fetalen Periode der Leberentwicklung galt lange Zeit der Hepatoblast [2, 85-87]. In früheren Arbeiten konnten jedoch auch schon in dieser Phase verschiedenen Leberzelltypen nachgewiesen werden.

Die Fetalen Leber Epithel Progenitor Zellen, genannt FLEC, bilden eine der in der fetalen Periode der Leber identifizierten Zellgruppen [46-48]. Diese Zellen zeigen nach Transplantation in adulte, partiell hepatektomierte Rattenlebern sowohl das Potential zur Differenzierung in alle epithelialen Bestandteile der Leber als auch die Fähigkeit der

Repopularisierung ganzer Lebersegmente. Proliferation und Differenzierung zeigen dabei signifikante Unterschiede in Abhängigkeit der angewandten Transplantationsmodelle. Bei vorheriger Behandlung der Empfängerleber mit Retrorsine zeigen die transplantierten fetalen Leberzellen eine positive Expression der Marker der unreifen Leberzelle CK-19, Albumin und AFP. Nach Transplantation in eine unbehandelte Leber zeigen sich überwiegend Zellen mit einem entweder hepatischen oder gallengangsspezifischen Phänotyp. Ein Teil der Zellen exprimiert ausschließlich AFP und Albumin, der andere Teil zeigt eine positive Markerexpression nur für CK-19 [46]. Auch wenn die gallengangsspezifische Differenzierung in der aktuellen Arbeit unerforscht bleibt, zeigen die Fetalen Leber Epithel Zellen mit ihrem starken Proliferationspotential und der Fähigkeit der leberspezifischen Differenzierung Parallelen zu den in dieser Arbeit untersuchten Zellen.

Fetale Leber Epithel Zellen konnten darüber hinaus auch in fetalem Lebergewebe der Maus identifiziert werden. Auch diese Zellen weisen ein weitreichendes Proliferationspotential sowie die Fähigkeit zur Repopularisierung ganzer Lebersegmente im Rahmen von Transplantationsversuchen auf [48].

In weiteren Studien wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Wachstum und Differenzierung der Fetalen Leber Epithel Zellen untersucht. Es zeigt sich eine Zunahme der leberspezifischen Genexpression unter Zugabe von den Wachstumsfaktoren HGF, EGF und FGF [47]. In der aktuellen Arbeit werden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM zeigt sich ein stärker ausgeprägtes hepatisches Differenzierungspotential als unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der größere Anteil an Wachstumsfaktoren am Stammzellmedium Stem Span SFEM darstellen.

In anderen Arbeiten wurde anhand charakteristischer Zellmarker, wie z.B. anhand des adulten Oval Cell Markers OC.3, verschiedene Zelltypen der fetalen Rattenleber identifiziert [41, 88]. Brill et al. isolierten OC-Antigen-positive Zellen aus embryonalen, neonatalen und adulten Rattenlebern und untersuchten ihr Wachstumspotential in vitro. Unter den OC-Antigen-positiven Zellen konnten drei Subpopulationen identifiziert werden: (i) hepatische Progenitoren, (ii) gallengangsspezifische Progenitoren und (iii) Progenitoren der Hämatopoese mit einem geringen Anteil von potentiell pluripotenten Hepatoblasten [88]. Diese Ergebnisse zeigen die zeitgleiche Existenz unterschiedliche

Zellkompartimente auch schon in der fetalen Leber und gleichen diesbezüglich den Ergebnissen dieser Arbeit.

Suzuki et al. entwickelten eine Methode zur Anreicherung hepatischer Progenitorzellen. Mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) können Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen der fetalen Mäuseleber isoliert und angereichert werden. Der Nachweis der hämatopoetischen Markerexpression in dieser Zellpopulation zeigt negative Ergebnisse. Nach Transplantation der mittels FACS angereicherten Zellen in eine Empfängermilz wandern diese Zellen in die Leber ein und differenzierten zu parenchymatösen Leberzellen [43]. Diese Ergebnisse belegen die Effektivität eines alternativen Verfahrens zur Anreicherung einzelner Zellpopulationen.

In der aktuellen Arbeit werden unter Verwendung des Magnetic Cell Sorting (MACS) zwei Zelltypen der fetalen Rattenleber isoliert, angereichert und in Bezug auf Wachstum und Differenzierung analysiert. Die Zelltypen werden anhand ihrer charakteristischen Markerexpression unterschieden, wobei der Stammzellmarker Thy-1 als Unterscheidungskriterium dient. Die eine Zellart exprimiert sowohl diesen Stammzellmarker als auch die Leberzellmarker CK-18, Albumin und α -Fetoprotein, die andere Zellart zeigt nur für die Leberzellmarker positive Ergebnisse. Sowohl die Thy-1-negativen als auch die Thy-1-positiven Zellen zeigen die Fähigkeit der Zellteilung und damit eine positive Wachstumskinetik. Da beide Zellarten zumindest zu Beginn der Zellkultur ausnahmslos leberspezifische Marker exprimieren, ist es anzunehmen, dass es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich um hepatische Zellen handelt. Die Expression des Lebermarkers α -Fetoprotein scheint unter den untersuchten Markern über die größte Beständigkeit zu verfügen. Die Expression kann annähernd kontinuierlich in Kultur- und Schwangerschaftsverlauf festgestellt werden. Die Expression der Marker Albumin und Cytokeratin-18 zeigt mit Fortschreiten der Zellkultur negative Ergebnisse, welches auf eine Dedifferenzierung der Zellen im Kulturverlauf hindeuten könnte. Ähnliche Erkenntnisse konnten auch in früheren Studien gewonnen werden [42]. Die geringere Ausprägung der hepatischen Markerexpression im Schwangerschaftsverlauf ist besonders bei den Thy-1-positiven Zellen ersichtlich und könnte für eine Entdifferenzierung der Zellen mit Fortschreiten der Schwangerschaft sprechen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Thy-1-positiven Zellen mit ihrem hohen Wachstumspotential und der Tendenz der früheren Entdifferenzierung stammzellartige Eigenschaften zeigen. Dies gibt Anlass, sie als Vorläufer der adulten

Oval Cells zu betrachten. Dieses Potential bleibt über mehrere Passagen in vitro erhalten. Die Thy-1-negativen Zellen zeigen mit ihrem ebenfalls hohen Wachstumspotential und dem anhaltenden Expressieren hepatischer Marker große Ähnlichkeit zu den reifen Hepatozyten der adulten Leber und präsentieren sich als deren potentielle Vorläufer. Diese Ergebnisse entsprechen wiederum den Erkenntnissen früherer Studien [39]. Gegen Ende der Schwangerschaft nimmt das Wachstumspotential besonders der Thy-1-negativen Zellen ab, welches auf eine fortschreitende Differenzierung der Zellen mit Verlust der Proliferationsfähigkeit schließen lässt. Ähnliche Effekte konnten auch in anderen Studien beobachtet werden. Ein höherer BrdU-Markierungsindex der an Schwangerschaftstag 19 isolierten Zellen im Vergleich zu Zellen des 21. Gestationstages verdeutlicht den gegenläufigen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und Wachstumspotential [70].

Nicht nur in der fetalen Leber der Ratte, sondern auch in der humanen fetalen Leber wurden hepatischen Progenitoren gefunden. Sie exprimieren die hämatopoetischen Stammzellmarker CD 117 und CD 34 und zeigen die Fähigkeit der Differenzierung zu Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen sowie zu pankreatischen Zellen. Zellen mit positivem Expressionsnachweis pankreatischer Marker und hämatopoetischer Stammzellmarker zeigen sich besonders im ersten Trimenon der Schwangerschaft, während die Zellen mit hepatischer Markerexpression vor allem im zweiten Trimenon gefunden werden. Die CD 117+/CD 34+/CD 90- Zellen exprimieren sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene hepatische Marker, wie z.B. Albumin oder α -Fetoprotein [49]. Die humanen hepatischen Progenitoren zeigen sowohl in Bezug auf die Expression hepatischer Marker als auch in Hinsicht auf die multipotenten Differenzierungsmöglichkeiten ähnliche Ergebnisse wie die in der aktuellen Arbeit untersuchten Zellen. Auch der in dieser Arbeit untersuchte Leberstammzellmarker Thy-1 wird von Zellen der humanen fetalen Leber exprimiert. Die Thy-1-positiven Zellen exprimieren verschiedene Stammzellmarker und coexprimieren biliäre und hepatische Marker auf Gen- und Proteinebene [50]. Thy-1 ist damit nicht nur als Stammzellmarker der fetalen Leber der Ratte, sondern auch als Stammzellmarker der fetalen humanen Leber anzusehen. Diese Ergebnisse belegen die Gemeinsamkeiten der Leberentwicklung von Ratte und Mensch und bekräftigen die Relevanz der aktuellen Arbeit für die Entwicklung humanmedizinischer Therapieansätze von Lebererkrankungen.

7.2 Darstellung möglicher Fehlerquellen

Eine mögliche Fehlerquelle, die die Verfälschung der Ergebnisse zur Folge haben könnte, stellt die Methode der Zelltrennung dar. Da die Leber in der fetalen Periode maßgeblich an der Hämatopoese beteiligt ist, ist es denkbar, dass die Methode der Zelltrennung mittels Magnetic Cell Sorting (MACS) keine ausreichende Reinheit der Zellisolate gewährleisten kann. Auch wenn sich diese Methode zur Elimination hämatopoetischer Zellen in früheren Studien als effektiv darstellte [39], ist bei den oben erläuterten Ergebnissen der Wachstums- und Differenzierungsanalyse von dem Vorliegen von Mischpopulationen aus hepatischen und hämatopoetischen Zellen auszugehen. Andere Methoden der Elimination der hämatopoetischen Zellen, beispielsweise mittels Zellpanning an einer Petrischale oder mittels Fluorescence Activated Cells Sorting FACS, zeigen in Bezug auf die Restkontamination vergleichbare Ergebnisse [41, 88, 89]. Auch die Trennung der Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellen mittels MACS, in früheren Studien ebenfalls als effizient bewertet [40], scheint nicht in genügendem Maße erfolgt zu sein. Dies ist wiederum an den Ergebnissen der Wachstums- und Differenzierungsanalyse ersichtlich. Das Versuchsdesign der Zellpassage fördert möglicher Weise zusätzlich die Entstehung von Mischpopulationen im Kulturverlauf.

Bei der Auswertung der RCR-Analyse ist zu bedenken, dass es sich lediglich um eine semiquantitative Untersuchungsmethode handelt. Die Zellkultur wird global analysiert, so dass Aussagen über die Einzelzellen durch die PCR-Analyse nicht getroffen werden können.

Des Weiteren ist abzuwägen, ob die Differenzierung der Zellen vorwiegend von der Zellart oder von den Kulturbedingungen abhängig ist. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Kulturbedingungen, veränderbar durch verschiedene Medienzusätze oder durch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die Entwicklung der Zellen in großem Maße leiten. Beispielsweise kann die Entwicklung fetaler Hepatozyten abhängig von den Kulturbedingungen in Richtung Leberzelle oder in Richtung biliäre Zelle geleitet werden [3]. In einer anderen Studie haben die fetalen Hepatozyten unter der Zugabe von Hydrocortison eine länger anhaltende AFP-Synthese sowie eine unterdrückte Albuminbildung gezeigt [90]. Eine stärker ausgeprägte leberspezifische Genexpression sowie eine striktere Zellorganisation konnten in einer weiteren Studie unter Kultivierung fetaler Hepatozyten der Ratte mittels Fibronektinmatrix erreicht werden [91]. Es ist daher nicht abschließend geklärt, ob die erforschten Unterschiede in Bezug

auf die Differenzierung der Zellen tatsächlich auf die verschiedenen Zellarten zurückzuführen sind oder ob es sich vielmehr um Folgen der Kulturbedingungen handelt.

7.3 Beantwortung der fünf Leitfragen

1. Welche Unterschiede weisen die Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellen bezüglich ihres Wachstumsverhaltens auf?

Sowohl die Thy-1-positiven als auch die Thy-1-negativen Zellen zeigen potentiell die Fähigkeit der Zellteilung in Kultur und damit ein Kulturwachstum. Das Wachstumspotential der Thy-1-negativen Zellen übersteigt in der Mehrzahl der untersuchten Kulturzeitpunkte das der Thy-1-positiven Zellen, wobei bei der Interpretation dieser Ergebnisse ein Überwucherungsphänomen der untersuchten Zellen mit Zellen des hämatopoetischen Systems zu bedenken ist.

2. Welche Unterschiede zeigen die Thy-1-positiven und Thy-1-negativen Zellen in Bezug auf ihre Differenzierung?

Unabhängig von Kulturmedium und Isolationstag exprimieren die Thy-1-negativen Zellen - verglichen mit den Thy-1-positiven Zellen - die leberspezifischen Gene Albumin, Cytokeratin-18 und α -Fetoprotein über einen längeren Kulturzeitraum mit einer höheren Anzahl von Passagen. Mit fortschreitendem Kulturverlauf ist jedoch eine Abnahme der Expression zu verzeichnen.

3. Welchen Einfluss hat die Auswahl des Mediums auf Wachstumskinetik und Differenzierung?

Unter Betrachtung der gesamten Kulturperiode zeigt sich eine stärkere Zellproliferation bei Verwendung des Fetalen Hepatozyten Mediums FHM. Der initial höhere Kulturerfolg sowie die stärker ausgeprägte leberspezifische Differenzierung werden jedoch unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM festgestellt.

4. Welchen Einfluss hat der Zeitpunkt der Isolation auf Wachstumskinetik und Differenzierung?

Die Thy-1-positiven Zellen zeigen ein höheres Wachstumspotential nach Isolation an Schwangerschaftstag 20. Die stetigere Expression der

leberspezifischen Marker sowie das überlegene Zellwachstum der Thy-1-negativen Zellen zeigen sich nach Isolation am 16. Gestationstag.

5. Ist es möglich aus den einzelnen Zellpopulationen mittels Zellpassagierung Zelllinien zu generieren?

Nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit erscheint es möglich, aus den einzelnen Zellpopulationen Zelllinien unter Beibehaltung des hepatischen Differenzierungspotentials zu generieren. Die Zellpassagierung scheint hierfür eine geeignete Methode darzustellen. Die Eigenschaften der Zellen bleiben über mehrere Passagen stabil, sind jedoch nicht unendlich. Der Verlust der Zelleigenschaften beginnt etwa ab der 3. bis 4. Zellpassage.

7.4 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser und vorausgegangener Arbeiten ergeben sich zahlreiche Aspekte, an die weiterführende Studien anknüpfen könnten.

Die in der aktuellen Arbeit untersuchten Thy-1-positiven Zellen weisen Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten OC.3-positiven fetalen Hepatozyten auf. Die Beziehung dieser beiden Zelltypen zueinander blieb bislang jedoch unerforscht. Zum einen ist es denkbar, dass beide Zelltypen parallel in der fetalen Leber existieren. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein und denselben Zelltyp handelt.

Auch die Beziehung zwischen Thy-1-positiven fetalen Zellen und den adulten Oval Cells ist bisher undefiniert. Möglicherweise stellen die Thy-1-positiven Zellen das fetale Äquivalent der adulten Oval Cells dar.

Da der Stammzellmarker Thy-1 nicht nur ein bekannter Marker der adulten Oval Cells, sondern auch Marker der Hämatopoese ist, liegt es nahe, eine enge Verbindung zwischen Hepatozyten und hämatopoetischen Zellen zu vermuten. Diese Verbindung ist ebenfalls in weiteren Forschungen genauer zu untersuchen.

Das Differenzierungspotential der Thy-1-positiven Zellen in Richtung gallengangsspezifischer Zellen bleibt in dieser Arbeit unerforscht und könnte Inhalt weiterführender Arbeiten sein.

Ebenso sind die Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung hepatischer Stammzellen im Rahmen von Lebererkrankungen noch nicht ausreichend geklärt. Die experimentelle Behandlung von Lebererkrankungen mittels Hepatozytentransplantation zeigt jedoch erfolgsversprechende Ergebnisse [92-96]. Im Tiermodell zeigen Spenderhepatozyten nach Transplantation die Fähigkeit mehr als 90 % der Empfängerhepatozyten zu

ersetzen. Die Autoren nennen diesen Vorgang “therapeutische Leber Repopularisierung“ [97]. In einer anderen Arbeit wurde die Entwicklung fetaler Hepatozyten des 21. Gestationstages nach Transplantation in eine Empfängermilz untersucht. Als Empfänger dienten Ratten mit mutationsbedingtem unzureichendem Serumalbuminspiegel. Die fetalen Hepatozyten zeigten die Fähigkeit der Migration in die Leber mit Normalisierung des Albuminspiegels [98]. Die hepatischen Stammzellen zeigen bezüglich der therapeutischen Nutzung Vorteile gegenüber den Hepatozyten. Zum einen können die Stammzellen in Kultur mühelos expandiert werden, zum anderen zeigt sich potentiell die Möglichkeit, mittels Stammzelltransplantation die Entstehung gesunder Tochterzellen zu bewirken [94]. Die Rolle der fetalen Leberstammzellen in der Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte ist bislang noch nicht ausreichend untersucht. Neben den Risiken des Gebrauchs undifferenzierter Zellen, sind ethische und rechtliche Aspekte in diesem Zusammenhang zu diskutieren.

8 Verzeichnisse

8.1 Abbildungsverzeichnis

2 Einleitung

2.1	Schematische Darstellung der posterioren Oberfläche der Leber	2
2.2	Embryo der 7. Schwangerschaftswoche mit Leberanlage	3

3 Material und Methoden

3.1	Schematische Darstellung des Versuchsdesigns	9
3.2	Darstellung der unterschiedlichen Zellarten sowie der jeweiligen Versuchsbedingungen	10
3.3	Auflistung der verwendeten Chemikalien	11
3.4	Auflistung der verwendeten technischen Geräte	12
3.5	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Glaswaren	13
3.6	Übersicht der Zentrifugationsbedingungen	14
3.7	Zusammensetzung der Percoll-Gradienten	14
3.8	Übersicht der Zellzählungen mittels Trypan-Blau-Methode	15
3.9	Sprague-Dawley Ratte	16
3.10	Zusammensetzung der Isolationslösungen	17
3.11	Zusammensetzung des Fetalen Hepatozyten Mediums FHM	18
3.12	Zusammensetzung des fetalen Stammzellmediums Stem Span SFEM	18
3.13	Isolationszahlen der an Schwangerschaftstag 16 durchgeführten Zellisolationen	22
3.14	Isolationszahlen der an Schwangerschaftstag 20 durchgeführten Zellisolationen	23
3.15	Zusammensetzung des PCR-Mixes	26
3.16	RT-PCR-Parameter	26

3 Material und Methoden (*Fortsetzung*)

3.17	Ablauf der PCR	27
3.18	Sequenzen der verwendeten Primer	27

4 Ergebnisse

4.1	Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	33
4.2	Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	36
4.3	Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	39
4.4	Graphische und tabellarische Darstellung der Wachstumskinetik der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	42
4.5	Graphische und tabellarische Darstellung des prozentualen Zellwachstums der Thy-1-positiven und Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	45
4.6	Graphische und tabellarische Darstellung des prozentualen Zellwachstums der Thy-1-positiven und Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	47
4.7	Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-negativen Zellen des 16. Gestationstages in prozentualen Zellzahlen	49
4.8	Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-negativen Zellen des 20. Gestationstages in prozentualen Zellzahlen	50

4 Ergebnisse (*Fortsetzung*)

4.9	Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in prozentualen Zellzahlen	52
4.10	Graphische und tabellarische Darstellung des Zellwachstums der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM in prozentualen Zellzahlen	53
4.11	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	58
4.12	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	59
4.13	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	59
4.14	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	60
4.15	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen	60
4.16	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 16 isolierten Zellen	61
4.17	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen	61
4.18	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellen	62
4.19	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	62
4.20	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit Fetalem Hepatozyten Medium FHM	63
4.21	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-positiven Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	63

4 Ergebnisse (*Fortsetzung*)

4.22	Auswertung der RT-PCR Ergebnisse der Thy-1-negativen Zellen unter Kultivierung mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM	64
4.23	Albumin-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur	65
4.24	Albumin-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur	65
4.25	Albumin-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur	65
4.26	CK-18-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur	66
4.27	CK-18-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur	66
4.28	Albumin-Expression einer an Gestationstag 20 isolierten Zellkultur	66
4.29	AFP-Expression einer an Gestationstag 16 isolierten Zellkultur	67
4.30	AFP-Expression einer an Gestationstag 20 isolierten Zellkultur	68
4.31	AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages	69
4.32	AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages	69
4.33	AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages	70
4.34	AFP-Expression unter Einfluss des Isolationstages	70
4.35	Albumin-Expression unter Einfluss des Isolationstages	71
4.36	Albumin-Expression unter Einfluss des Isolationstages	71
4.37	Albumin-Expression unter Einfluss des Isolationstages	72
4.38	CK-18-Expression unter Einfluss des Isolationstages	72
4.39	CK-18-Expression unter Einfluss des Isolationstages	73
4.40	An Kulturtag 3, 23 und 33 erfolgte immuncytochemische Auswertung des Leberzellmarkers Cytokeratin-18 einer Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten Zellkultur des 16. Schwangerschaftstages	74
4.41	An Tag 10 der Zellkultur erfolgte immuncytochemische Auswertung der Leberzellmarker α -Fetoprotein, Albumin und Cytokeratin-18 einer Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versorgten Zellkultur des 16. Schwangerschaftstages	74

4 Ergebnisse (*Fortsetzung*)

- 4.42 An Tag 10 der Zellkultur erfolgte immuncytochemische Auswertung 74
des Leberzellmarkers Albumin einer Thy-1-positiven mit Fetalem
Hepatozyten Medium FHM versogten, einer Thy-1-negativen mit
Fetalem Hepatozyten Medium FHM versogten, einer Thy-1-positiven
mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versogten und einer
Thy-1-negativen mit dem Stammzellmedium Stem Span SFEM versogten
Zellpopulation einer an Schwangerschaftstag 20 isolierten Zellkultur

8.2 Abkürzungsverzeichnis

AAF-2	N-2-Acetylaminofluor	FITC	Fluorescein	Iso-Thio-
AFP	Alpha-Feto-Protein		Cyanate	
APAAP	Alkalische-Phosphatase- Anti-Alkalische- Phosphatase	FLEC	Fetal Liver Epithelial Cell	
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridine	GAPDH	Glycer-Aldehyd-3- Phosphat-De-Hydrogenase	
BSA	Bovines Serum Albumin	HBSS	Hank's Bufferes Saline Solution	
CCL ₄	Carbon-Tetrachlorid	Hepes	N-2-Hydroxyethyl-N'-2- Piperazine-	
CD	Cluster of Differentiation		Ethanesulfonsäure	
c-DNA	complementary Deoxyribonucleic Acid	HGF	Hepatozyte Growth Factor	
CK	Cyto-Keratin	HRP	Horseradish Peroxidase	
c-Kit	zellulärer Tyrosinkinaserzeptor	Ig	Immunglobulin	
dd H ₂ O	double destilles Water	mAb	monoclonal Antibody	
DNA	Deoxyribonucleic Acid	MACS	Magnetic Cell Sorting	
dNTP	deoxy-Nucleotide- Tri-Phosphate	mRNA	messenger Ribonucleic Acid	
dTT	Dithiothreitol	MW	Mittelwert	
ED	Embryonal Day	OX	Overexpress	
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra- Acetat	PBS	Phosphate Buffered Saline	
EGF	Epidermal Growth Factor	PdN ₆	Hexadeoxynucleotid Primer	
EGTA	Ethylene-Glycol-bis-2- Aminoethylether- N,N,N'N'-Tetraacetic Acid	RNA	Ribonucleic Acid	
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	rpm	round per minute	
FCS	Fetal Calf Serum	RT-Mix	Reverse Transkriptase Mix	
FGF	Fibroblast Growth Factor	RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaktion	
FHM	Fetales Hepatozyten Medium	SCF	Stem Cell Factor	
		SFEM	Stammzellmedium Stem Span	
		STD	Standardabweichung	

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	Thy-1	Thymus Cell Antigen 1,
Taq	Thermus Aquaticus		theta
TER	Erythrocyte Cell Antigen		

8.3 Literaturverzeichnis

1. Wilson, J.W., C.S. Groat, and E.H. Leduc, *Histogenesis of the Liver*. Ann N Y Acad Sci, 1963. **111**: p. 8-24.
2. Shiojiri, N., J.M. Lemire, and N. Fausto, *Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development*. Cancer Res, 1991. **51**(10): p. 2611-20.
3. Germain, L., M.J. Blouin, and N. Marceau, *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*. Cancer Res, 1988. **48**(17): p. 4909-18.
4. Sell, S., *Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells*. Hepatology, 2001. **33**(3): p. 738-50.
5. Thorgeirsson, S.S., *Hepatic stem cells in liver regeneration*. Faseb J, 1996. **10**(11): p. 1249-56.
6. Thorgeirsson, S.S., et al., *Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment*. Proc Soc Exp Biol Med, 1993. **204**(3): p. 253-60.
7. Alison, M.R., M.H. Golding, and C.E. Sarraf, *Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree*. Cell Prolif, 1996. **29**(7): p. 373-402.
8. Strain, A.J. and H.A. Crosby, *Hepatic stem cells*. Gut, 2000. **46**(6): p. 743-5.
9. Crosby, H.A., D.A. Kelly, and A.J. Strain, *Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium*. Gastroenterology, 2001. **120**(2): p. 534-44.
10. Baumann, U., et al., *Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell?* Hepatology, 1999. **30**(1): p. 112-7.
11. Petersen, B.E., et al., *Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat*. Hepatology, 1998. **27**(2): p. 433-45.
12. Theise, N.D., et al., *The canals of Hering and hepatic stem cells in humans*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1425-33.
13. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, *Liver regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
14. Vessey, C.J. and P.M. de la Hall, *Hepatic stem cells: a review*. Pathology, 2001. **33**(2): p. 130-41.
15. Haruna, Y., et al., *Identification of bipotential progenitor cells in human liver development*. Hepatology, 1996. **23**(3): p. 476-81.
16. Evarts, R.P., et al., *A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver*. Carcinogenesis, 1987. **8**(11): p. 1737-40.
17. Lazaro, C.A., et al., *Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5514-22.
18. Petersen, B.E., et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. Science, 1999. **284**(5417): p. 1168-70.
19. Theise, N.D., et al., *Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 235-40.
20. Strain, A.J., *Changing blood into liver: adding further intrigue to the hepatic stem cell story*. Hepatology, 1999. **30**(4): p. 1105-7.
21. Theise, N.D., et al., *Liver from bone marrow in humans*. Hepatology, 2000. **32**(1): p. 11-6.
22. Alison, M.R., et al., *Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 257.
23. Lagasse, E., et al., *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1229-34.
24. Krause, D.S., et al., *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. Cell, 2001. **105**(3): p. 369-77.
25. Korblyng, M., et al., *Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells*. N Engl J Med, 2002. **346**(10): p. 738-46.
26. Oh, S.H., et al., *Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 500-4.
27. Mitaka, T., *Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(1): p. 1-5.

28. Crosby, H.A. and A.J. Strain, *Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived?* Gut, 2001. **48**(2): p. 153-4.
29. Mitaka, T., et al., *Growth and maturation of small hepatocytes.* J Gastroenterol Hepatol, 1998. **13 Suppl**: p. S70-7.
30. Tateno, C., et al., *Heterogeneity of growth potential of adult rat hepatocytes in vitro.* Hepatology, 2000. **31**(1): p. 65-74.
31. Tateno, C. and K. Yoshizato, *Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells.* Am J Pathol, 1996. **149**(5): p. 1593-605.
32. Overturf, K., et al., *Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes.* Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1273-80.
33. Rhim, J.A., et al., *Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation.* Science, 1994. **263**(5150): p. 1149-52.
34. Ponder, K.P., *Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies.* Faseb J, 1996. **10**(7): p. 673-82.
35. Petersen, B.E., V.F. Zajac, and G.K. Michalopoulos, *Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats.* Hepatology, 1998. **27**(4): p. 1030-8.
36. Yin, L., et al., *Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl4/2-AAF injury.* Histol Histopathol, 2002. **17**(1): p. 65-81.
37. Gordon, G.J., et al., *Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response.* Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 607-19.
38. Gordon, G.J., et al., *Isolation, short-term culture, and transplantation of small hepatocyte-like progenitor cells from retrorsine-exposed rats.* Transplantation, 2002. **73**(8): p. 1236-43.
39. Fiegel, H.C., et al., *Characterization of cell types during rat liver development.* Hepatology, 2003. **37**(1): p. 148-54.
40. Fiegel, H.C., et al., *Hepatic lineages isolated from developing rat liver show different ways of maturation.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(1): p. 46-53.
41. Sigal, S.H., et al., *Characterization and enrichment of fetal rat hepatoblasts by immunoadsorption ("panning") and fluorescence-activated cell sorting.* Hepatology, 1994. **19**(4): p. 999-1006.
42. Fiegel, H.C., et al., *Cell growth and differentiation of different hepatic cells isolated from fetal rat liver in vitro.* Tissue Eng, 2006. **12**(1): p. 123-30.
43. Suzuki, A., et al., *Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver.* Hepatology, 2000. **32**(6): p. 1230-9.
44. Taniguchi, H., et al., *Usefulness of flow-cytometric cell sorting for enrichment of hepatic stem and progenitor cells in the liver.* Transplant Proc, 2000. **32**(2): p. 249-51.
45. Suzuki, A., et al., *Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver.* J Cell Biol, 2002. **156**(1): p. 173-84.
46. Dabeva, M.D., et al., *Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver.* Am J Pathol, 2000. **156**(6): p. 2017-31.
47. Kawasaki, T., et al., *Effects of growth factors on the growth and differentiation of mouse fetal liver epithelial cells in primary cultures.* J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(6): p. 857-64.
48. Nierhoff, D., et al., *Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity.* Hepatology, 2005. **42**(1): p. 130-9.
49. Nava, S., et al., *Characterization of cells in the developing human liver.* Differentiation, 2005. **73**(5): p. 249-60.
50. Masson, N.M., et al., *Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(1): p. G45-54.
51. Tavian, M., M.F. Hallais, and B. Peault, *Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo.* Development, 1999. **126**(4): p. 793-803.

52. Tavian, M., et al., *The human embryo, but not its yolk sac, generates lymphomyeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm*. *Immunity*, 2001. **15**(3): p. 487-95.
53. Medlock, E.S. and J.L. Haar, *The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis*. *Anat Rec*, 1983. **207**(1): p. 31-41.
54. Isabel, Z., et al., *Isolation, characterization and culture of Thyl-positive cells from fetal rat livers*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(24): p. 3841-7.
55. Tateno, C. and K. Yoshizato, *Growth and differentiation of adult rat hepatocytes regulated by the interaction between parenchymal and non-parenchymal liver cells*. *J Gastroenterol Hepatol*, 1998. **13 Suppl**: p. S83-92.
56. Chen, Y., et al., *Transplantation of human hepatocytes cultured with deleted variant of hepatocyte growth factor prolongs the survival of mice with acute liver failure*. *Transplantation*, 2005. **79**(10): p. 1378-85.
57. Hamamoto, R., M. Kamihira, and S. Iijima, *Growth and differentiation of cultured fetal hepatocytes isolated various developmental stages*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999. **63**(2): p. 395-401.
58. Hasuike, S., et al., *Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **20**(11): p. 1753-61.
59. Qin, A.L., et al., *[Effects of growth factors and extracellular matrix on proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cell in vitro]*. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2004. **12**(7): p. 406-9.
60. Runge, D.M., et al., *Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes*. *J Hepatol*, 1999. **30**(2): p. 265-74.
61. Efimova, E.A., et al., *Changes in serum levels of growth factors in healthy individuals after living related liver donation*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(2): p. 1074-5.
62. Ishii, T., et al., *Hepatocyte growth factor stimulates liver regeneration and elevates blood protein level in normal and partially hepatectomized rats*. *J Biochem (Tokyo)*, 1995. **117**(5): p. 1105-12.
63. Oe, H., et al., *Hepatocyte growth factor as well as vascular endothelial growth factor gene induction effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in Solt-Farber rats*. *Hepatogastroenterology*, 2005. **52**(65): p. 1393-7.
64. Tahara, M., et al., *Hepatocyte growth factor leads to recovery from alcohol-induced fatty liver in rats*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(3): p. 313-20.
65. Okumoto, K., et al., *Differentiation of rat bone marrow cells cultured on artificial basement membrane containing extracellular matrix into a liver cell lineage*. *J Hepatol*, 2005. **43**(1): p. 110-6.
66. Fiegel, H.C., et al., *Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells*. *Stem Cells*, 2003. **21**(1): p. 98-104.
67. Lange, C., et al., *Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(29): p. 4497-504.
68. Lange, C., et al., *Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(1): p. 276-9.
69. Lange, C., et al., *Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(15): p. 2394-7.
70. Gruppuso, P.A., T.C. Bienieki, and R.A. Faris, *The relationship between differentiation and proliferation in late gestation fetal rat hepatocytes*. *Pediatr Res*, 1999. **46**(1): p. 14-9.
71. Reid, L.M., *Stem cell biology, hormone/matrix synergies and liver differentiation*. *Curr Opin Cell Biol*, 1990. **2**(1): p. 121-30.
72. Xu, C., et al., *Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium*. *Stem Cells*, 2005. **23**(3): p. 315-23.
73. Yamashita, K., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the thrombopoietin mRNA expression in rat hepatocytes and cirrhotic rat livers*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000. **15**(1): p. 83-90.

74. Grunnet, N., X. Peng, and N. Tygstrup, *Growth factors and gene expression in cultured rat hepatocytes*. J Hepatol, 1999. **31**(1): p. 117-22.
75. Tateno, C. and K. Yoshizato, *Growth potential and differentiation capacity of adult rat hepatocytes in vitro*. Wound Repair Regen, 1999. **7**(1): p. 36-44.
76. Hundertmark, S., et al., *Effect of epidermal growth factor on enzymes of phospholipid biosynthesis in lung and liver of fetal rat in vivo and in vitro*. Horm Metab Res, 1999. **31**(1): p. 8-13.
77. Sanchez, A., et al., *Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and EGF promote cord-like structures that indicate terminal differentiation of fetal hepatocytes in primary culture*. Exp Cell Res, 1998. **242**(1): p. 27-37.
78. Voci, A., et al., *Relationship between DNA synthesis and growth factor expression in primary cultures of adult rat hepatocytes*. Boll Soc Ital Biol Sper, 1996. **72**(5-6): p. 139-45.
79. Guren, T.K., et al., *Epidermal growth factor behaves as a partial agonist in hepatocytes: effects on DNA synthesis in primary culture and competition with transforming growth factor alpha*. Growth Factors, 1996. **13**(3-4): p. 171-9.
80. Cai, J., et al., *Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells*. Hepatology, 2007. **45**(5): p. 1229-39.
81. Duret, C., et al., *Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1779-90.
82. Saji, Y., et al., *Basic fibroblast growth factor promotes the trans-differentiation of mouse bone marrow cells into hepatic lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors*. J Hepatol, 2004. **41**(4): p. 545-50.
83. Shi, X.L., et al., *Hepatocyte-like cells from directed differentiation of mouse bone marrow cells in vitro*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(4): p. 469-76.
84. Gomez-Lechon, M.J., et al., *Effects of hepatocyte growth factor on the growth and metabolism of human hepatocytes in primary culture*. Hepatology, 1995. **21**(5): p. 1248-54.
85. Lemire, J.M. and N. Fausto, *Multiple alpha-fetoprotein RNAs in adult rat liver: cell type-specific expression and differential regulation*. Cancer Res, 1991. **51**(17): p. 4656-64.
86. Nagy, P., H.C. Bisgaard, and S.S. Thorgeirsson, *Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation*. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 223-33.
87. Faris, R.A., et al., *Antigenic relationship between oval cells and a subpopulation of hepatic foci, nodules, and carcinomas induced by the "resistant hepatocyte" model system*. Cancer Res, 1991. **51**(4): p. 1308-17.
88. Brill, S., et al., *Hepatic progenitor populations in embryonic, neonatal, and adult liver*. Proc Soc Exp Biol Med, 1993. **204**(3): p. 261-9.
89. Taniguchi, H., et al., *Evidence for the presence of hepatic stem cells in the murine fetal liver*. Transplant Proc, 1999. **31**(1-2): p. 454.
90. Freeman, A.E., et al., *Differentiation of fetal liver cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3659-63.
91. Sanchez, A., et al., *Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 242-50.
92. Malhi, H. and S. Gupta, *Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2001. **8**(1): p. 40-50.
93. Ott, M., et al., *Emerging therapies in hepatology: liver-directed gene transfer and hepatocyte transplantation*. Cells Tissues Organs, 2000. **167**(2-3): p. 81-7.
94. Feldmann, G., *Liver transplantation of hepatic stem cells: potential use for treating liver diseases*. Cell Biol Toxicol, 2001. **17**(2): p. 77-85.
95. Sundback, C.A. and J.P. Vacanti, *Alternatives to liver transplantation: from hepatocyte transplantation to tissue-engineered organs*. Gastroenterology, 2000. **118**(2): p. 438-42.
96. Mizuguchi, T., et al., *Hepatocyte transplantation for total liver repopulation*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005. **12**(5): p. 378-85.

97. Grompe, M., *Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases*. J Inherit Metab Dis, 2001. **24**(2): p. 231-44.
98. Sierra, E., et al., *Liver gene expression and increase in albumin synthesis by fetal hepatocytes transplanted into analbuminemic rats*. Life Sci, 2000. **67**(20): p. 2417-32.

9 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Dietrich Kluth für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Dr. med. Henning C. Fiegel für die professionelle wissenschaftliche Betreuung bei der Planung, Organisation und Durchführung der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Beate Roth für ihre qualifizierte und stets freundliche Unterstützung. Des Weiteren danke ich den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Herrn Helge Bruns, Frau Christina Höper und Herrn Daniel Schultze für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern Renate und Wolfgang Ahrend sowie meiner Schwester Julia Ahrend danke ich für die Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich durch mein Studium begleitet haben.

10 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vor- und Zuname	Jana Isabel Ahrend
Geburtsdatum	27.08.1982
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Nationalität	Deutsch
Meldeadresse	Blankeneser Landstrasse 81, 22587 Hamburg

Schulbildung

1988 – 1992	Grundschule Gorch-Fock (Hamburg)
1992 – 2001	Gymnasium Blankenese (Hamburg) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note 1,6

Wissenschaftliche Ausbildung

2001 – 2007	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
September 2003	Ärztliche Vorprüfung
2006 – 2007	Praktisches Jahr
Oktober/November 2007	Staatsexamen, Note 1,5
2004 – 2007	Experimentelle Doktorarbeit in der Abteilung für Kinderchirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

11 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

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.

Ferner versichere ich, 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. Jana Isabel Ahrend