

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel R. Zander

**Einfluss einer Kokultivierung mit Hepatozyten auf die  
leberspezifische Genexpression von Mesenchymalen Stammzellen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

**Philipp Bassler aus Hamburg**

Hamburg, 2010

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.03.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Axel Zander

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Thomas Rostock

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. Giesa Tiegs

---

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1	DIE LEBER .....	4
1.2	ERKRANKUNGEN DER LEBER.....	4
1.3	LEBERREGENERATION .....	5
1.4	TISSUE ENGINEERING.....	7
1.5	ADULTE STAMMZELLEN .....	7
1.5.1	<i>Charakteristika von adulten Stammzellen .....</i>	<i>7</i>
1.5.2	<i>Adulte Stammzellen in der Leberregeneration.....</i>	<i>8</i>
1.6	RELATION ZWISCHEN HSCS UND OVALZELLEN .....	9
1.7	LEBERCHIMÄRISMUS NACH ORGANSPENDE.....	10
1.8	IN VITRO PRODUKTION VON HEPATOZYTEN.....	11
1.9	HEPATOZYTENKULTUR .....	12
1.9.1	<i>Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Hepatozyten.....</i>	<i>12</i>
1.9.2	<i>Kokultur von Hepatozyten.....</i>	<i>12</i>
1.10	MESENCHYMALE STAMMZELLEN.....	13
1.11	FRAGESTELLUNG DER DISSERTATION .....	14
<b>2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>16</b>
2.1	CHEMIKALIEN .....	16
2.2	CYTOKINE .....	17
2.3	KULTURMEDIUM .....	17
2.4	ELEKTROPHORESEPRODUKTE.....	17
2.5	KITS .....	17
2.6	GERÄTE .....	18

---

<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1	VERSUCHSAUFBAU .....	19
3.2	ISOLATION UND TRANSDUKTION DER MSCs.....	20
3.3	VORBEREITEN DER WELL – PLATTEN.....	21
3.4	ISOLATION DER RATTENHEPATOZYTEN .....	21
3.5	EINSÄEN DER KOKULTUR .....	23
3.6	MEDIUMWECHSEL .....	23
3.7	ZELLTRYPsinIERUNG.....	24
3.8	ZELLZÄHLUNG .....	24
3.9	LÖSEN UND TRENNEN DER ZELLEN .....	24
3.10	FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS) .....	25
3.11	ISOLIERUNG VON RNA.....	26
3.12	REVERSE TRANSKRIPTASE POLYMERASE KETTEN REAKTION (RT – PCR) .....	27
3.13	POLYMERASE KETTEN REAKTION ( PCR).....	27
3.14	AGAROSE - GEL – ELEKTROPHORESE.....	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
4.1	ÜBERSICHT ÜBER DIE GEWINNUNG DER ERGEBNISSE.....	33
4.2	MSC MONOKULTUR.....	37
4.2.1	<i>PCR Ergebnisse</i> .....	38
4.3	HEPATOZYTEN MONOKULTUR.....	44
4.3.1	<i>PCR Ergebnisse</i> .....	45
4.4	KOKULTUR .....	51
4.4.1	<i>PCR Ergebnisse</i> .....	53

4.5	ZUSAMMENFASSUNG DER GESAMTEN VERSUCHSERGEBNISSE .....	59
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
5.1	EINLEITENDE FRAGESTELLUNG.....	61
5.2	PHYLOGENETIK DER LEBERMARKER.....	62
5.3	GENEXPRESSION UND CHARAKTERISTIKA VON MSCS .....	62
5.4	INTERPRETATION DER VERSUCHSERGEBNISSE VOR DEM WISSENSCHAFTLICHEN HINTERGRUND .....	64
5.5	WACHSTUMSFAKTOR HGF.....	64
5.6	DAS THERAPEUTISCHE POTENTIAL VON MSCs.....	65
5.7	AUSBLICK.....	67
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>87</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>88</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>89</b>
<b>13</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>90</b>

# **1 Einleitung**

## ***1.1 Die Leber***

Innerhalb des menschlichen Organismus stellt die Leber ein essentielles Organ dar. Die Leber übernimmt als Organ viele Aufgaben. So zählt die Entgiftung von potentiell toxischen Stoffen dazu. Aber die Leber übernimmt auch Aufgaben in der Kontrolle des Kohlenhydrathaushaltes und sorgt für einen ausgeglichenen Blutzuckerspiegel. Der Lipidstoffwechsel wird ebenfalls durch die Leber organisiert. Dies ist nicht zuletzt dadurch möglich, dass die Leber hierfür durch ihre anatomische Lage und ihr einzigartiges Blutversorgungssystem prädestiniert ist [1]. Die Leber bekommt nicht nur sauerstoffreiches Blut über die Arterien zugeführt, es findet zusätzlich eine Perfusion über die V. portae statt. Die Pfortader dient den unpaaren Abdominalorganen als venöser Abfluss und führt so der Leber auch die intestinal zugeführten Stoffe, insbesondere Proteine und Kohlenhydrate, zu. So ist die Leber in der Lage, direkt oral Zugeführtes zu verstoffwechseln und die Homöostase im Organismus aufrechtzuerhalten. Aber auch schädliche Substanzen können so weitgehend vor einer systemischen Verteilung im Körper „entgiftet“ werden. Des Weiteren werden viele lebenswichtige Proteine in der Leber hergestellt, wie Albumin und wichtige Elemente des Gerinnungssystems.

## ***1.2 Erkrankungen der Leber***

Wie wichtig die Leber und ihre Aufgaben sind, macht sich bei einer Erkrankung dieser bemerkbar. In der Hepatologie gibt es diverse Krankheitsbilder, bei denen es zu einer Einschränkung einer Leberteilfunktion kommen kann. Ist zum Beispiel die Verarbeitung von Proteinen und eine Entgiftung aufgrund eines Leberschadens nicht mehr möglich, droht eine hepatische Enzephalopathie mit einem eventuellen Koma [1]. Jedoch kann es auch zu einem Totalausfall der Leber kommen, wie zum Beispiel bei einem akuten Leberversagen. Dies führt

ohne einen Leberersatz unweigerlich zum Tode. Bisher ist ein kurativer Ansatz nur mittels einer Lebertransplantation zu erreichen, da ein Ersatz der komplexen intrahepatischen Reaktionen und Funktionen zu bewältigen ist. Da es aufgrund eines allgemeinen Organmangels bei weitem nicht möglich ist, jedem Patienten auf der Transplantationswarteliste ein Spenderorgan zukommen zu lassen, ist die Suche nach einem alternativen Organersatz ein bedeutendes Forschungsfeld.

### ***1.3 Leberregeneration***

Auf der Suche nach einem Leberersatz stellt sich die Frage nach einer Leberregeneration. Schon seit Langem ist die Fähigkeit der Leber, sich selber zu regenerieren, bekannt. Dies lässt sich bereits in der antiken Mythologie finden, wo sich die Leber von Prometheus jeden Tag aufs Neue selber regenerierte. Dieses Phänomen der Organregeneration konnte auch experimentell nachgewiesen werden. Nach einer teilweisen Hepatektomie bei Nagetieren, bei der bis zu  $\frac{2}{3}$  der Leberlappen entfernt und die verbliebenen Leberlappen intakt in situ belassen wurden, ließ sich zeigen, dass die verbliebenen Leberlappen bis zur vorherigen Größe des Organs nachwachsen, indem es zu Hyperplasien kam [2]. Dabei war bei Nagetieren bereits nach 5 Tagen eine komplette Rekonstitution gesehen worden [3].

Auch nach Transplantation einer Leber in einen Empfänger, der von der Körpergröße her größer war als der Spender, kam es zu einem adäquaten Wachstum des gespendeten Organs auf ein der Körpergröße des Empfängers entsprechendes Volumen [4]. Dabei sind es mehrere Zellarten, die in einer intakten Leber vorkommen. Dazu zählen neben den Hepatozyten auch das Gallengangssystem bildende Zellen sowie Kupfferzellen und Itozellen. Jedoch beginnen die Hepatozyten als erste Zellart mit der Proliferation, um somit die Organgröße wiederherzustellen [5]. Diese Beobachtung wurde durch eine erkennbare vermehrte DNA Produktion sowie eine gesteigerte Mitose in den Hepatozyten im Tierversuch bestätigt [1,6,7]. Und noch etwas konnte hierbei

beobachtet werden: Nach einer gewissen Latenzzeit von einigen Tagen kam es nach einer erfolgten Proliferation zu einer hohen Rate an Apoptosevorgängen [6]. Dies dürfte regulierend auf die Rekonstitution wirken und eine überschießende Größenzunahme der Leber verhindern.

Kommt es zu einem akuten Leberschaden, können die Hepatozyten so geschädigt werden, dass sie an einer Regeneration der Leber nicht mehr teilnehmen können. Im Tierexperiment ließ sich so ein akutes Leberversagen gut durch die Gabe von Toxinen wie zum Beispiel 2-Acetylaminofluoren (AAF) oder Tetrachlormethan (CCl<sub>4</sub>) provozieren und simulieren. Untersuchte man die Hepatozyten anschließend, zeigte sich eine deutlich reduzierte Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe [8]. Doch auch hierbei zeigte die Leber regenerative Fähigkeiten. Wenn man die Leber histologisch nach Eintreten des akuten Leberversagens untersucht, findet man periportal gehäuft kleine Zellen, die sich durch einen ovalen Zellkern hervorheben [9-12]. Diese Zellen werden als ovale Zellen oder Ovalzellen nach der ovalen Morphologie des Zellkerns bezeichnet. Ovalzellen sind kleiner als Hepatozyten und Gallengangszellen. Die Mitochondrien sind kleiner als in den Leberzellen, insgesamt gibt es nur wenig Zytoplasma und wenig Zellorganellen [13-16]. Im weiteren Verlauf der Regeneration konnte in vivo eine Umwandlung in Hepatozyten und in Zellen des Gallengangssystems nachgewiesen werden [17].

Aber auch in menschlichen Lebern konnten diese Vorläuferzellen gefunden werden [18], unter anderem im Zusammenhang mit der Entstehung maligner Tumore [19]. Nach Verabreichung kanzerogener Substanzen ließ sich bei Ratten die Induktion maligner Tumore in der Leber histologisch nachvollziehen. Und auch hierbei fanden sich Ovalzellen, beginnend bereits in den ersten Tagen nach Gabe der Substanzen [9,14,20].

Ovalzellen sind unter anderem durch folgende Merkmale charakterisiert [12]:

1. Sie sind geringgradig differenziert,
2. sie sind zu einer bemerkenswerten Proliferation fähig,
3. sie können sich in zwei verschiedene Zellarten differenzieren, die Hepatozyten und die Gallengangsepithelzellen.

Es ist möglich, Ovalzellen in adulten Lebern, jedoch auch in Embryos nachzuweisen und sie unter bestimmten Bedingungen in vitro zu kultivieren [21-24] und hierbei eine Proliferation zu erreichen. Auch eine in vitro Differenzierung in Hepatozyten ist möglich.

### ***1.4 Tissue Engineering***

Sucht man eine Alternative zu einer Organtransplantation durch eine Organspende, ist das sogenannte „Tissue Engineering“, also das Konstruieren dreidimensionaler Zellverbände in vitro und anschließende Transplantation, allein schon aufgrund der Organspendesituation eine attraktive Alternative. Da man in der Regel nicht auf Hepatozyten des Patienten zurückgreifen kann, ist eine Suche nach anderen Zellarten erforderlich. Ovalzellen scheinen wie oben aufgeführt durchaus in der Lage zu sein, sowohl Leberzellen als auch Zellen des biliären Systems hervorzubringen. Jedoch ist die Gewinnung dieser Vorläuferzellen aus Hepatozyten in der Regel bei vielen Lebererkrankungen nicht möglich, so dass sie keine zufriedenstellende Alternative als Ausgangsmaterial für eine Gewebekonstruktion darstellen.

### ***1.5 Adulte Stammzellen***

#### **1.5.1 Charakteristika von adulten Stammzellen**

Hier gerieten adulte Stammzellen zunehmend in den Fokus der Forschung. Stammzellen sind undifferenzierte Zellen und durch folgende Fähigkeiten charakterisiert [25-28]:

1. Proliferation
2. Selbsterneuerung
3. Produktion verschiedener differenzierter Zellen

#### 4. Regeneration beschädigten Gewebes.

Damit erfüllen Stammzellen optimale Voraussetzungen für die Verwendung zum Tissue Engineering.

##### **1.5.2 Adulte Stammzellen in der Leberregeneration**

Die ersten Hinweise für einen möglichen Einsatz adulter Stammzellen für die Leberregeneration erbrachten folgende Untersuchungen:

Weibliche Ratten wurden einer tödlichen Strahlendosis durch Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt und das hämatopoetische System durch eine Transplantation des Knochenmarks männlicher Ratten gerettet. Danach wurde den transplantierten Ratten experimentell ein schwerer Leberschaden zugefügt. Nach der anschließenden teilweisen Hepatektomie fanden sich wie oben bereits beschrieben Ovalzellen, welche sich im Verlauf in Hepatozyten umwandelten. Das Besondere war, dass die Ovalzellen und schließlich auch die Leberzellen männlichen Ursprungs waren, nachgewiesen durch das Vorhandensein von Y-Chromosomen [29]. Auch bei Mäusen konnten Theise et al. eine ähnliche Entdeckung machen. Nachdem sie ebenfalls weibliche Tiere bestrahlten, wurde ihnen Knochenmark von männlichen Mäusen injiziert. Wurden anschließend die Lebern der ansonsten lebergesunden Tiere entnommen, konnten auch hier in den Hepatozyten Y-Chromosomen nachgewiesen werden [30]. Über den Nachweis der Y-Chromosomen und damit des männlichen Ursprungs gelang bei den Untersuchungen der Beweis, dass die Zellen aus dem männlichen Spenderorganismus und daher letztlich aus dem transplantierten Knochenmark stammten. Eine Arbeitshypothese war, dass die im Knochenmark enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in die Leber einwanderten, dort differenzierten und somit für die in der Leber nachgewiesenen männlichen Ovalzellen und Hepatozyten verantwortlich waren. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die HSC nicht zwingenderweise direkt in Hepatozyten differenzieren, sondern eher eine Fusion von reiferen knochenmarksabstammenden Monozyten mit den Leberzellen stattfindet [31,32].

---

## ***1.6 Relation zwischen HSCs und Ovalzellen***

Wie bei vielen anderen Zellen auch ist es möglich, bei Ovalzellen Proteine an der Zelloberfläche, sogenannte Oberflächenantigene, nachzuweisen. Hierzu gehören OV 6 [15,33,34], A6 [35,36] und OC.2 [37]. Neben weiteren Oberflächenmarkern gelang bei Ovalzellen auch der Nachweis von Thy-1 [38-40]. Hiermit wurde zum Einen ein weiteres Merkmal entdeckt, um Ovalzellen zu identifizieren und ggf. auch zu sortieren. Thy-1 war zuerst unter anderem im Gehirn und Thymozyten nachgewiesen worden. Es ist jedoch auch ein Marker für HSCs [41,42]. C-Kit und CD 34 sind weitere Oberflächenantigene, welche zum Identifizieren von HSCs verwendet werden, sowohl für humane als auch für Mäusezellen [43-45]. Es gelang, diese Proteine ebenfalls in Ovalzellen nachzuweisen [46,47]. Ovalzellen verfügen daher über Oberflächenantigene, welche sich auch insbesondere bei HSCs finden. Ursächlich für gemeinsame Charakteristika könnte die Ontogenese sein. In der fetalen Entwicklung spielt die Leber für die Hämatopoese eine entscheidende Rolle [48,49]. Im postnatalen Verlauf verliert die Leber dann diese Funktion und die Hämatopoese findet im Knochenmark statt. Doch auch im erwachsenen Organismus findet unter bestimmten Umständen, zum Beispiel bei einer Leukämie [50], eine extramedulläre Hämatopoese in der Leber statt. Eine extramedulläre Hämatopoese konnte im Tierversuch bei Ratten durch die Gabe eines Makrophagenaktivators provoziert werden [51]. Hierbei fanden sich dann fokale hämatopoetische Einheiten in der Leber.

Auch in gesunden Mäusen lassen sich in der Leber HSCs nachweisen [52]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist eine Relation zwischen der Blutbildung, welche im adulten Organismus durch HSCs mehrheitlich im Knochenmark stattfindet, und der Leber erkennbar. Dies könnte sowohl das Vorhandensein gemeinsamer Oberflächenantigene als auch das Potential von HSCs, sich in Hepatozyten zu differenzieren, erklären.

Um dies weiter zu untersuchen, wurden Mäuse verwendet, die an einer Tyrosinämie erkrankt waren und somit an einer fortschreitenden Lebererkrankung litten. Injizierte man diesen Mäusen nach einer Bestrahlung Knochenmark, so kam es unter anderem zu einer verbesserten Leberfunktion, gemessen an den

Serumparametern Bilirubin und Transaminasen. Auch histologisch kam es zu einem Umbau der Leberarchitektur mit Kolonien von suffizienten Hepatozyten. Die gleichen Ergebnisse wurden auch erzielt, bereitete man das Knochenmark auf und injizierte weiblichen Mäusen reine HSCs von männlichen Spendern. Dass die entstandenen intrahepatischen Kolonien in Beziehung zu den injizierten HSCs standen, konnte hier ebenfalls über den Y-Chromosom Nachweis erfolgen [53]. Vassilopoulos et al. konnten im gleichen Mausversuch in den untersuchten Lebern nachweisen, dass die Leberregeneration auf Zellfusionsereignisse zurückzuführen sein könnte [54]. Weitere Hinweise für Zellfusionen als Ursache der Leberregeneration konnten auch durch eine Reihe von Transplantationen an Mäusen mit unterschiedlichen Genmutanten durch zytogenetische Untersuchung gewonnen werden [55].

Für humane HSCs stammend aus dem Knochenmark und aus Nabelschnurblut konnten ebenfalls Hinweise für eine potentielle Leberregeneration erhalten werden. Hierzu transplantierten Wang et al. immundefizienten Mäusen humane HSCs und provozierten 4 Wochen später einen schweren Leberschaden durch die Verabreichung von Tetrachlormethan (CCl<sub>4</sub>). Im weiteren Verlauf konnten dann in den Hepatozyten mRNA für humanes Albumin sowie im Serum der Mäuse entsprechend humanes Albumin nachgewiesen werden [56]. Erste Hinweise für die von Wang et al. beobachteten Phänomene erbrachte die Transplantation von Zellen aus humanen Nabelschnurblut in immundefiziente Mäuse mit anschließender Untersuchung der Leber. Hierbei gelang es, humane Hepatozyten nachzuweisen. Im Gegensatz zu den obigen Untersuchungen [54,55] konnten hierbei jedoch Zellfusionen als Entstehungsmechanismus der Hepatozyten ausgeschlossen werden [57,58].

### ***1.7 Leberchimärismus nach Organspende***

Nach den oben dargestellten Ergebnissen in Tierversuchen wurden daraufhin auch Patienten nach Knochenmarktransplantationen gezielt untersucht. Bekamen

Patientinnen Knochenmark von männlichen Spendern transplantiert, so konnten in der Leber Hepatozyten mit Y-Chromosomen nachgewiesen werden. Diese Zellen mussten aus dem gespendeten Knochenmark hervorgegangen sein. Einen weiteren Hinweis für das Vorhandensein extrahepatischer Möglichkeiten der humanen Leberregeneration erbrachte die Untersuchung von gespendeten weiblichen Lebern in männliche Empfänger. Mussten die gespendeten Lebern wieder entfernt werden zum Beispiel wegen eines Rezidivs der Erkrankung, so fanden sich in den entnommenen Lebern auch Hepatozyten mit einem Y-Chromosom. Diese mussten sich im Empfängerorganismus extrahepatisch entwickelt haben, da die männliche Leber zuvor komplett entfernt wurde [59,60].

Auch nach Transplantation von peripher gewonnenen Stammzellen zur Behandlung einer Knochenmarkerkrankung konnten Y-Chromosomen bei Einsatz männlicher Spenderzellen in Leberbiopsien von Patientinnen mit Hilfe der Fluoreszenz in Situ Hybridisation (FISH) nachgewiesen werden [61].

### ***1.8 In vitro Produktion von Hepatozyten***

Nachdem man in vivo das Potential entdeckt hatte, mit Hilfe von Knochenmark und insbesondere HSCs in vivo Hepatozyten zu regenerieren, hatte sich die Frage nach einer in vitro Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gestellt. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst Knochenmark aus der Ratte entnommen und kultiviert. Gibt man dem Kulturmedium den Wachstumsfaktor Hepatocyte Growth Factor (HGF) hinzu, so zeigt sich eine leberspezifische Genexpression. [62,63]. So konnte von Schwartz et al. gezeigt werden, dass unter der Gabe von FGF-4 und HGF eine Differenzierung von multipotent adult progenitor cells (MAPC) in Hepatozyten möglich war, nachgewiesen durch das Vorhandensein von Hepatozytenmarkern [64]. Hierfür wurden die MAPCs unter Zugabe von Serum und den Faktoren HGF und FGF-4 kultiviert, da die kombinierte Gabe von HGF und FGF-4 eine höhere Rate an differenzierten MAPCs als die jeweilige Einzelgabe von HGF und FGF-4 ergab. Eine Zugabe von weiteren Zytokinen wie

FGF-7, aFGF und bFGF ergab bei den MAPCs keine weitere Steigerung der Differenzierung [64].

Eine in vitro Differenzierung von Ovalzellen in Hepatozyten ist ebenfalls durch HGF möglich [65]. Auch für humane HSCs konnte eine in vitro Differenzierung in Hepatozyten erreicht werden [66]. So wurde eine leberspezifische Genexpression bei einer Kultivierung mononukleärer Zellen aus humanem Nabelschnurblut unter Zugabe von HGF sowie auch in vivo gezeigt [67].

## ***1.9 Hepatozytenkultur***

### **1.9.1 Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Hepatozyten**

In vitro hat sich gezeigt, dass für Hepatozyten bestimmte Bedingungen herrschen müssen, damit die Zellen überleben. Hierzu gehört die Verwendung eines chemisch definierten Mediums (HGM), welches neben dem HGF noch weitere Zytokine enthält [68,69]. Von gleicher Bedeutung ist die Oberfläche, auf der die Hepatozyten kultiviert werden. Verschiedene Matrixmoleküle sind hier untersucht worden [70,71]. So konnten Dunn et al. deutlich bessere Ergebnisse in Bezug auf die Hepatozytenmorphologie und Hepatozytenfunktion durch ein zweilagiges Sandwichmodell, bestehend aus Kollagen, erhalten im Vergleich zu einem einschichtigen Modell [72].

### **1.9.2 Kokultur von Hepatozyten**

Bei der Kultivierung von Hepatozyten zeigt sich in einer Monokultur ein rascher Funktionsverlust und eine Veränderung der Morphologie. Jedoch ist es durch eine Kokultivierung mit Zellen verschiedenster Herkunft möglich, Hepatozyten über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und dabei deren Funktion zu erhalten [73-78]. Die Erkenntnis, dass Hepatozyten sich erfolgreich über einen längeren Zeitraum in einer Kokultur in vitro halten ließen, fand auch Eingang in der weiteren Forschung mit Stammzellen. Okumoto et. al. untersuchten für Zellen aus

dem Knochenmark von Ratten neben der Differenzierung in Anwesenheit von hohen Dosen HGF einen weiteren Ansatz. Die entnommenen Zellen wurden nicht in einem Serum mit HGF kultiviert, sondern mit Hepatozyten zusammen kultiviert. Hierbei waren die beiden Zellgruppen nur durch eine semipermeable Membran getrennt. Nach drei Tagen konnte eine leberspezifische Genexpression bei den Knochenmarkzellen nachgewiesen werden [63]. Diese Ergebnisse wurden von Jang et al. bei Mäusen bestätigt, die neben in vivo Versuchen eine Kokultur von HSCs und Hepatozyten, ebenfalls getrennt durch eine Membran in zwei verschiedenen Kammern, durchführten [79]. Auch hier konnte eine hepatische Differenzierung der HSCs gezeigt werden. Jedoch konnten Fusionsereignisse zwischen Hepatozyten und den Stammzellen ausgeschlossen werden. Hierfür bediente man sich der FISH-Technik. Die HSCs stammten aus männlichen Mäusen und die Leberzellen waren weiblichen Ursprungs. Da sich lediglich diploide (XY) und tetraploide (XYXY) Zellen mit den angegebenen männlichen Karyotypen in der HSC-Kammer fanden, konnten Fusionen zwischen weiblichen und männlichen Zellen ausgeschlossen werden. Hierdurch konnte ein in vitro Einfluss der Hepatozyten auf die hepatische Differenzierung der Stammzellen gezeigt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass eine Kokultivierung mit Hepatozyten optimale Bedingungen für eine Differenzierung von Stammzellen in Hepatozyten schafft.

### ***1.10 Mesenchymale Stammzellen***

Neben den bereits erwähnten HSCs finden sich im Knochenmark Mesenchymale Stammzellen (MSCs). Friedenstein et al. fanden einen Hinweis auf deren Existenz, indem sie das osteogenetische Potential von Knochenmark entdeckten [80]. Hierfür wurde Knochenmark in Kunststoffkammern injiziert und diese in Mäuse intraperitoneal implantiert. Histologische Untersuchungen zeigten, dass sich im Verlauf knochenhaltiges Gewebe entwickelte.

Kultiviert man Knochenmark, finden sich hierbei Zellen, die im Gegensatz zu den HSCs sich länger kultivieren lassen und ein adhärentes Verhalten zeigen. In einem in vivo Versuch zeigten diese Zellen dann die Fähigkeit, Knochen und Knorpel zu bilden [81]. Es ist möglich, die hierfür verantwortlichen Zellen, die MSCs, aus Knochenmarkaspirationen zu isolieren [82,83]. Die Fähigkeit zur Osteo- und Chondrogenese war namensgebend, da man erkannte, dass MSCs zu einer Differenzierung in die verschiedenen mesenchymalen Gewebe potentiell fähig waren. So konnte auch in vitro die Fähigkeit zur Osteo-, Chondro- und Adipogenese sowie zur Differenzierung in Muskelzellen gezeigt werden [84-87]. Charakteristisch ist für MSCs im Gegensatz zu HSCs neben einer Plastikadhärenz die gute Kultivierbarkeit mit hohen Proliferationsraten. Es gibt für MSCs keinen spezifischen Oberflächenmarker [88]. Untersucht man MSCs auf Oberflächenantigene, so sind sie negativ für die hämatopoetischen Marker CD45, CD34 und CD14 [84,89-92]. Nachweisen lassen sich auf MSCs unter anderem die Oberflächenmarker SB-10 [93], CD105 [94] und CD73 [95]. Im Knochenmark besteht die Aufgabe der MSCs unter anderem darin, dem hämatopoetischen System ein unterstützendes Bindegewebe zu bieten [96].

### ***1.11 Fragestellung der Dissertation***

Die Fragestellung der vorliegenden Dissertation ist: Inwiefern ist eine Differenzierung von MSCs in Hepatozyten möglich? Um dieses zu untersuchen, wurden MSCs unter identischen Bedingungen wie HSCs bei Fiegel et al. kultiviert [66]. Bei diesen Autoren kam es zu einer Differenzierung der HSCs in Hepatozyten, nachgewiesen durch das Vorhandensein leberspezifischer Gene. Dieser Effekt ließ sich bei MSCs jedoch nicht nachweisen. Auch unter einer Variation der Bedingungen und zusätzlichen Wachstumsfaktoren war eine Differenzierung von MSCs in einer Monokultur in hepatozytäre Richtung nicht möglich. Dies unterscheidet MSCs offensichtlich von MAPCs, die sich in einer Monokultur insbesondere unter dem Einsatz von HGF in Hepatozyten

differenzieren lassen [64]. Nachdem sich in einer Monokultur von MSCs keine Möglichkeit der Differenzierung aufzeigte, stellte sich die Grundsatzfrage, ob MSCs überhaupt zu einer hepatischen Differenzierung befähigt sind.

In der Dissertation wird daher der Ansatz einer Kokultivierung verfolgt. Lässt sich durch eine Kokultivierung von Hepatozyten und MSCs eine Differenzierung der Stammzellen zu Hepatozyten *in vitro* erreichen? Der Versuchsaufbau der Kokultur beinhaltet dabei zwei wichtige Aspekte. Zum Einen war ein direkter Zellkontakt zwischen den Hepatozyten und den MSCs gegeben. Des Weiteren wurde ein Medium verwendet, welches aus Wachstumsfaktoren und insbesondere HGF bestand. Die sich stellende Frage war, ob eine Kokultur zusammen mit Hepatozyten einen Vorteil gegenüber der reinen Monokultur darstellte.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden MSCs und Hepatozyten über einen Zeitraum von insgesamt 21 Tagen kultiviert und die MSCs zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Expression leberspezifischer Gene untersucht. Hierzu wurde die RNA aus den MSCs extrahiert, in DNA umgeschrieben und im Anschluss mittels PCR die Erbinformation weiter erforscht. Dabei wurde die gewonnene cDNA systematisch auf das Vorhandensein von Abschnitten untersucht, die in der RNA der Kodierung der Proteine Albumin, CK-18, CK-19 und AFP entsprachen.

## **2 Materialien**

### **2.1 Chemikalien**

Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

DMEM / HAM's F-12, w / o L- Glutamine, Fa. Biochrom AG, Berlin

Stem Span, Fa. Stem Cell Technologies, St. Katherinen, Germany

Fetal Calf Serum (FCS), Fa. Biochrom AG, Berlin

Penicillin, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Streptomycin, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

L-Glutamin, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Protaminsulfat, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Fibronectin, Fa. Sigma, Seelzen

Taq-Polymerase, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Dexamethason, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Destilliertes Wasser, Fa. Baxter

NaCl, Fa. Merck

KCl, Fa. Merck

HEPES, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Kollagenase, Fa. Roche

Trypsininhibitor, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

CaCl<sub>2</sub>, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Williams Medium, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe

Liquemin, Fa. Roche

## **2.2 Cytokine**

Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rh EGF), Fa. R & D, Wiesbaden

Recombinant Human Fibroblast Growth Factor – 4 (rh FGF – 4), Fa. R & D, Wiesbaden

Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor (rh HGF), Fa. AL-ImmunoTools, Friesoythe

Recombinant Human Stem Cell Factor (rh SCF), Fa. AL-ImmunoTools, Friesoythe

## **2.3 Kulturmedium**

50ml Stem Span + 0,8ml Penicillin / Streptomycin + 10ng/ml FGF – 4 + 100ng/ml SCF + 2,5nmol/L Dexamethason + 20ng/ml HGF + 50ng/ml EGF

## **2.4 Elektrophoreseprodukte**

Gene Ruler 100bp DNA ladder, Fa. Gibco, Karlsruhe

6 x Loading Dye Solution, Fa. Fermentas Life Sciences, Hanover, USA

Ethidiumbromid 10 mg / ml, Fa. Invitrogen, Karlsruhe

SeaKem LE Agarose, Fa. Cambrex, Kopenhagen, Dänemark

Agagel Maxi Phoreseschale, Fa. Biometra, Göttingen

## **2.5 Kits**

Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit, Fa. Invitex GmbH, Berlin

cDNA Synthese Kit, Fa. Amersham, Freiburg

Bulk Mix: Reverse Transkriptase, RNAGuard, RNase / DNase freies Rinderserumalbumin, dATP, dCTP, dGTP, dTTP

## **2.6 Geräte**

UNO Thermoblock, Fa. Biometra, Göttingen

Lichtmikroskop: Olympus CKX41, Fa. Olympus

Digitalkamera: Camedia C – 5050 Zoom, Fa. Olympus

Zentrifugen: Biofuge pico, Fa. Heraeus

Megafuge 1.0 R, Fa. Heraeus

Werkbank: Herasafe Typ HS 12 / 2, Fa. Heraeus

Inkubator: TS Autoflow, Fa. Nuaire

Pipetten: Pipetten research, Fa. Eppendorf, Hamburg

FACS Aria Cell Sorter, Fa. BD, Heidelberg

35µm Filter, Fa. BD, Heidelberg

Vasofix Braunüle, Fa. Braun

Nylonfilter 200µm, diverse Hersteller

Injektionskanülen, diverse Hersteller

---

## 3 Methoden

### 3.1 Versuchsaufbau

Für die Versuche dieser Arbeit wurde aus Lewis.1WR2 Ratten Knochenmark entnommen und die hierin enthaltenen MSCs isoliert und proliferiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Gen für Green Fluorescent Protein (GFP) transduziert. Die GFP<sup>+</sup> Zellen wurden kloniert und der Klon mit der höchsten Proliferationsrate wurde für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Aus Sprague-Dawley Ratten wurden Hepatozyten isoliert. Anschließend wurden die frisch isolierten Hepatozyten mit den GFP<sup>+</sup> MSCs zusammen in Well-Platten eingesät. Zur Kontrolle wurden jeweils Hepatozyten und MSCs parallel als Monokultur gehalten. Nach 1 Woche, 2 Wochen sowie 3 Wochen wurden die Zellen aus den Wellplatten gelöst. Die Zellen aus der Kokultur wurden mit Hilfe der Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Technik in GFP<sup>+</sup> und GFP<sup>-</sup> Zellen getrennt. Anschließend wurde aus den gewonnenen Zellen sowie aus den Zellen der Kontrollgruppen die RNA extrahiert. Die so gewonnene RNA wurde im nächsten Schritt mittels "reverser Transkription" in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine PCR unter Verwendung von Primern für Hepatozytenmarker zur Vervielfältigung eventuell vorhandener cDNA. Als letzter Schritt wurden die DNA-Proben auf einem Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe der Elektrophorese analysiert.

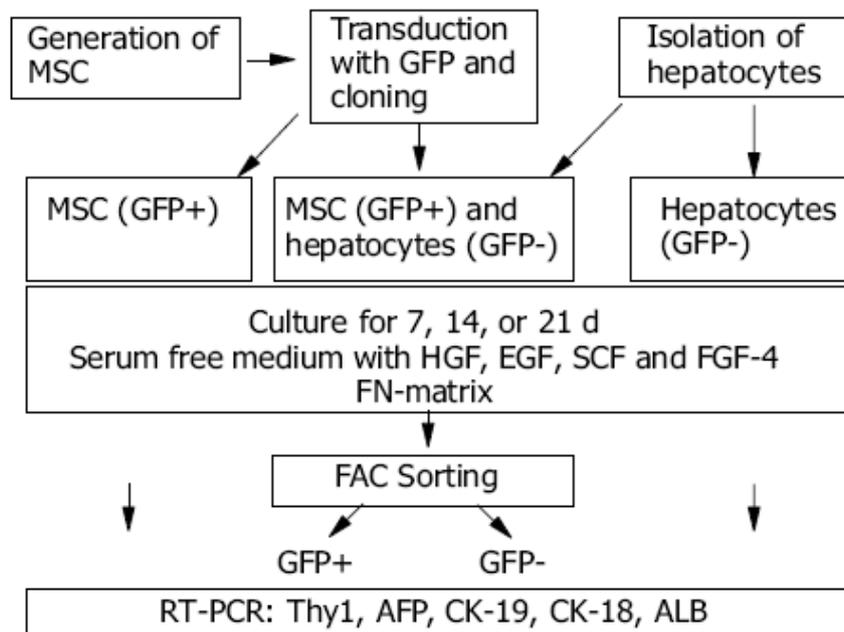


Abb. 1: Skizze des Versuchsablaufes (Aus [97])

### 3.2 Isolation und Transduktion der MSCs

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) stammten von einer Lewis.1WR2 Ratte. Um die MSCs aus der Ratte zu gewinnen, wurde das Knochenmark aus den beiden Femurknochen sowie den beiden Tibiae der Ratte entnommen und in einem Medium (DMEM / HAM's F-12+ 20 % vorselektioniertes Fetal Calf Serum + 1 % Penicillin / Streptomycin + 1 % L – Glutamin) aufgenommen und anschließend bei 37° C im Inkubator über mehrere Passagen kultiviert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden jeweils beim Mediumwechsel entfernt, während die plastikadhärenenten Zellen bis zur für MSCs typischen Konfluenz wuchsen. Die Plastikadhärenenz konnte dabei als ein Beweis dafür gewertet werden, dass es sich um MSCs handelte. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der MSC-Phänotyp anhand der Expression von CD59 und CD90 und des Fehlens von CD45 verifiziert. Ebenso wurde die Fähigkeit der MSC zu osteogener, chondrogener und

---

adipogener Differenzierung getestet und die Bildung von Zellen dieser 3 mesenchymalen Richtungen als Nachweis einer hochreinen MSC-Population gezeigt.

In der Passage 4 wurden die MSC dann transduziert [98]. Der Vektor mit der Bezeichnung SF $\alpha$  11 – GFP enthielt ein Gen für GFP. Mit GFP fluoreszieren die Zellen nach Anregung intensiv grün, dies konnte in der Kokultur für das Trennen in MSCs und Hepatozyten genutzt werden. Für die Transduktion wurden jeweils  $1 \times 10^3$  MSCs in ein Well auf einer 6-Wellplatte eingebracht und anschließend die Viruspartikel sowie 4 $\mu$ g/ml Protaminsulfat hinzugegeben. Bei Raumtemperatur wurden die Kulturplatten für 1 Stunde bei 1000 g zentrifugiert. In der anschließenden Durchflußzytometrie zeigte sich, dass 26 % der Zellen GFP positiv waren. Anschließend wurden die GFP positiven Zellen mit einer Konzentration von 0,3 Zellen / 100  $\mu$ l in einer 96 – Well – Platte kloniert. Für die weitere Arbeit wurde der Klon mit der höchsten Proliferationsrate ausgesucht (IG3) und bei -196 °C eingefroren.

### ***3.3 Vorbereiten der Well – Platten***

Damit die Zellen sich besser an die Oberfläche anheften konnten, wurden die verwendeten 24 – Well - Platten der Firma Greiner Labortechnik zunächst beschichtet. Jedes Well wurde mit 4  $\mu$ g Fibronectin in 400  $\mu$ l befüllt und für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Fibronectin mit einer Pipette abgesaugt und einmal mit ca. 300  $\mu$ l PBS nachgewaschen.

### ***3.4 Isolation der Rattenhepatozyten***

Um adulte Hepatozyten aus einer Sprague-Dawley Ratte zu gewinnen, wurde das Verfahren nach Seglen [99] mit leichten Abwandlungen angewendet [100].

---

Der narkotisierten Ratte wurde der Bauchraum durch einen V – förmigen Schnitt eröffnet. Die Darmschlingen wurden nach der Durchtrennung des Peritoneums zur Seite gelegt und der Leberhilus sowie die V. pylorica, V. portae, V. lienalis und die V. cava inferior dargestellt. Ligiert wurden die V. lienalis sowie die V. pylorica. Durch eine Injektion in die V. cava inferior erfolgte die Gabe von 250 IU Heparin, um eine Koagulation zu verhindern. Zwischen der V. lienalis und der V. pylorica wurde ein Loch hineingeschnitten, in das vorsichtig eine Venenverweilkanüle hineingeschoben wurde. Die Kanüle wurde dann durch Ligaturen fixiert. Die V. cava inferior wurde ebenfalls eingeschnitten, um einen Abfluss für die Spülflüssigkeiten zu schaffen.

Die Leber wurde mit einer Pufferlösung für 7 min perfundiert, um insbesondere Blut und andere unerwünschte Bestandteile aus der Leber zu waschen. Die Pufferlösung (in 1000ml destilliertem Wasser wurden 8,3 g NaCl, 0,5g KCl sowie 2,38g HEPES gelöst) wurde bei einer konstanten Temperatur von 37°C mit einer Flussgeschwindigkeit von 30ml/min perfundiert. Anschließend wurde die Leber mit einer Kollagenaselösung perfundiert (in 1000ml destilliertem Wasser wurden 8,3g NaCl, 0,5g KCl 2,38g HEPES, 0,7g CaCl<sub>2</sub>, 7,5mg Trypsin-Inhibitor und 500mg Kollagenase) bei ebenfalls 37°C und einer Fließgeschwindigkeit von 30ml/min, um die Leber weitgehend von mesenchymalen Inhalten zu befreien. Nach ca. 8 Minuten wurde die Leber aus dem Körper entnommen und die Leberkapsel unter sterilen Bedingungen eröffnet. Das Gewebe wurde in 20 ml Williams Medium ohne L-Glutamin aufgenommen, resuspendiert und durch einen Nylonfilter mit 200 µm großen Maschen gespült.

Die Zellsuspension wurde bei 50 g für 3 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet mit ca. 15 ml Williams Medium aufgefüllt.

Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 50g für 3 min. Der Überstand wurde erneut entfernt und die verbliebenen Zellen in 23 ml Williams Medium resuspendiert. Hierzu kamen 2,4 ml 10 fach konzentriertes PBS und vorsichtig 14,5 ml Percoll (Dichte = 1,130 g / ml).

---

Die Lösung wurde bei 400 g für 12 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun wurde das Pellet in 25 ml Williams Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert (400g für 12 Minuten).

Das entstandene Pellet konnte dann mit dem Kulturmedium aufgenommen werden und in die Kokultur eingesetzt werden.

### ***3.5 Einsäen der Kokultur***

Als erstes wurden für die Kokultur die MSCs eingesät, da sich diese an der Oberfläche anhefteten. Die gewünschte Konzentration an MSC betrug  $9 \times 10^4$  / Well, diese kamen mit je 0,5 ml des Kulturmediums in die Wells. Nach ca. 2 Stunden im Inkubator waren die Stammzellen zu einem großen Teil adhärent geworden, so dass vorsichtig das Medium bis auf einen Rest mit einer Pipette abgesaugt werden konnte. Die frisch isolierten Hepatozyten wurden mit einer Konzentration von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Well in 0,5 ml Kulturmedium jeweils zu den MSCs hinzugegeben.

Als Kontrollpopulationen dienten frisch isolierte Hepatozyten ( $6 \times 10^4$  / Well) als Positivkontrolle sowie MSCs ( $9 \times 10^4$  / Well) als Negativkontrolle in einer Monokultur, die mit dem gleichen Kulturmedium unter identischen Bedingungen gehalten wurden.

### ***3.6 Mediumwechsel***

Das Medium wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne dabei die Zellverbände zu lösen und somit Zellen mit abzusaugen. Die gleiche Menge frischen Mediums wurde langsam ohne Zerstörung der Zellen zugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

---

### ***3.7 Zelltrypsinierung***

Durch die Verwendung von Trypsin konnten die adhärenen Zellen sowohl von ihrer Unterlage als auch gleichzeitig aus ihren Zellverbänden gelöst werden.

Für den Vorgang „Trypsinierung“ wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette komplett abgesaugt und das Well einmal mit PBS nachgespült. Das hinzugegebene Trypsin wirkte für 10 Minuten bei 37 ° C im Inkubator ein. Anschließend wurden die gelösten Zellen in 3ml PBS aufgenommen.

### ***3.8 Zellzählung***

Mit Trypanblau wurden vitale Zellen von nicht vitalen Zellen differenziert.

Zum Zählen wurde ein kleines Volumen einer Zellsuspension mit Trypanblau vermischt und auf die Zählkammer aufgebracht. An einem Lichtmikroskop konnte nun die Zellzahl ermittelt werden.

### ***3.9 Lösen und Trennen der Zellen***

Zur Dokumentierung des zeitlichen Verlaufes wurde nach 7, 14 und 21 Tagen ein Teil der verwendeten Zellen trypsinisiert und der weiteren molekularbiologischen Untersuchung zugeführt. Für jede Versuchswoche wurde eine 24 – Well – Platte verwendet, in der 20 Wells wie oben aufgeführt mit einer Kokultur besiedelt waren. Als Kontrolle wurde eine weitere Platte mitgeführt, in der je 9 Wells mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle versehen waren. So konnten für eine Versuchswoche je 3 Kontrollwells geerntet werden.

Um die Zellen aus den Wells aufzunehmen, wurde zunächst das Medium komplett abgesaugt. Hierbei wurde mit der Pipette mehrmals resuspendiert, um die Zellverbände aufzulockern. Um die ersten gelösten Zellen nicht zu verlieren, wurde die Flüssigkeit nicht verworfen, sondern in ein 50 – ml Reagenzröhrchen überführt.

---

Es wurde mit ca. 300 µl PBS gespült und ebenfalls in das Reagenzröhrchen überführt. Als nächster Schritt erfolgte die Trypsinierung mit ca. 100µl Trypsin. Nach 10 Minuten Einwirkzeit des Trypsins kamen jeweils 500µl aus dem 50- ml Reagenzröhrchen in das Well, um die gelösten Zellen aufzunehmen. Nach einigen Resuspendierungen wurde die Zellsuspension entnommen und in das 50 – ml Reagenzröhrchen überführt.

Um die Zellen zu waschen, wurden die Zellsuspensionen bei 2.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Die Zellen hatten sich am Boden des Röhrchens angesammelt und waren deutlich als Pellet erkennbar. Das Zellpellet wurde vorsichtig in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach erneutem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet am Ende in 3 ml PBS aufgenommen und hieraus die Zellzählung vorgenommen.

Das Ernten der Kontrollpopulationen verlief bis zum letzten Schritt gleich. Am Ende wurde das hierbei entstehende Pellet jedoch in je 350 µl Lysis – Puffer aus dem RNA – Isolierungskit aufgenommen, während die Zellen aus der Kokultur der Zellzählung zugeführt wurden.

### ***3.10 Fluorescence activated cell sorting (FACS)***

Nach dem Entfernen der Zellen aus der Kokultur lag eine Zellsuspension bestehend aus GFP- und GFP+ Zellen, vom Versuchsaufbau den eingesetzten Hepatozyten und MSCs entsprechend, vor. Um diese Zellarten weiter zu untersuchen, war ein Trennen erforderlich. Hierfür wurde die FACS Technik mit einem FACS Aria Cell Sorter der Firma Becton Dickinson verwendet. Vor der Durchflußzytometrie wurden die Zellen mit einem 35µm Filter gefiltert, um möglichst einzelne Zellen zu erhalten.

Aufgrund des in den MSCs stabil integrierten GFP konnte nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488nm eine Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 518nm detektiert werden. Dadurch war es möglich, die nicht GFP-positiven Hepatozyten von den MSC zu trennen. Die so sortierten Zellen standen nun für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

---

### ***3.11 Isolierung von RNA***

Um aus den Zellen die RNA zu isolieren, wurde das Invisorb Spin Cell RNA Mini-Kit gemäß dem beiliegenden Protokoll angewendet. Zunächst war es erforderlich, die Zellmembranen aufzulösen; dies geschah mit Hilfe einer denaturierenden Substanz, dem Lysis – Puffer. Die hierin enthaltenen chaotropen Salze sorgten auch für eine Inaktivierung der RNAsen sowie sämtlicher Enzyme im Zytoplasma, um einen möglichen Abbau der im Zytoplasma vorhandenen RNA zu verhindern. Hierfür wurde jeweils 350µl Lysis Solution R pro Gruppe zu den Zellen gegeben. Als nächstes wurden dann die so lysierten Zellen auf einen DNA-Binding-Spin Filter in einem Receiver Tube stehend gegeben, um die vorhandene DNA aus dem Lysat zu entfernen. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute wurde mit 12.000 U/min 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der DNA-Binding-Spin Filter verworfen. Hiernach wurde eine gleiche Menge 70%igen Ethanol dem Lysat zugegeben und gut durchmischt. Auf einen RNA-Binding-Spin Filter in einem neuen Receiver Tube stehend wurde nun das Lysat aufgetragen. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 1 Minute wurde erneut mit 10.000 U/min für 30 Sekunden zentrifugiert. Die entstandene filtrierte Flüssigkeit wurde entfernt und 600µl Wash Puffer R1 auf den RNA-Binding Spin Filter gegeben und für 30 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Das hierbei entstehende Filtrat wurde erneut verworfen und als zweiter Waschvorgang 500µl Wash Puffer R2 auf den RNA Filter gegeben. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 U/min für 30 Sekunden. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Um eventuell vorhandene Ethanolreste zu entfernen, wurde der RNA Filter für 3 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert.

Als letzten Schritt musste die so gereinigte RNA aus dem RNA Filter gelöst werden. Hierzu wurde der Filter in ein RNAsen freies Elution Tube überführt und 40µl Elution Puffer R direkt auf die Membran des RNA Filters gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde bei 10.000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Der RNA Filter wurde verworfen und die frisch isolierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

---

### ***3.12 Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT – PCR)***

Die isolierte und gewonnene RNA musste zunächst in DNA umgeschrieben werden. Dabei entstand die sogenannte komplementäre DNA, cDNA, die zur mRNA komplementär ist.

Hierfür wurde das first-strand cDNA synthesis kit von Amersham nach beiliegendem Protokoll verwendet. Die RNA wurde bei 65 ° C für 10 Minuten inkubiert, um eventuell gebildete RNA-Doppelstränge zu lösen und Enzyme zu deaktivieren. Anschließend war eine Lagerung im Eisblock erforderlich, um einen Zusammenbruch der labilen RNA zu verhindern. Im Eisblock wurden dann zu jeder RNA-Probe 6µl DTT, 6µl Primer und 30µl Bulk Mix gegeben. Es wurde mit der Pipette mehrmals gut durchmischt und anschließend erfolgte die eigentliche RT-PCR bei 37°C für 1 Stunde im Thermoblock. Die so erhaltene cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20° gelagert.

### ***3.13 Polymerase Ketten Reaktion ( PCR)***

Um eine bestimmte Sequenz in einem DNA – Molekül zu vervielfältigen, wurde in dieser Arbeit die Technik der PCR benutzt. Die Menge der erhaltenen Basensequenzen wuchs dabei exponentiell an.

Von jeder Population wurden je 5µl cDNA für die PCR eingesetzt. Hierzu wurden jeweils 0,5µl dNTPs, 0,5µl Primer 1 (sense oder forward), 0,5µl Primer 2 (antisense oder backward), 2,5µl PCR Puffer, 0,5µl Taq Polymerase sowie 15,5µl destilliertes Wasser gegeben. Anschließend wurden im verwendeten Uno Thermoblock die unten angegebenen PCR Programme eingestellt und unter den angegebenen Konditionen die PCR durchgeführt:

- 1.) Aufbrechen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge (ssDNA) bei 94 ° C.
- 2.) Annealing: Binden der Primer an die entsprechende Sequenz der einzelsträngigen DNA bei einer Temperatur von 40 ° - 62 ° C, abhängig

vom Primer und dessen Länge. Hierdurch wird auch eine erneute Doppelstrangbildung der DNA verhindert.

- 3.) Extension: Beim Temperaturoptimum der Taq Polymerase von 72 ° C erfolgt die Synthese der DNA mit Hilfe der Nukleotide. Der Prozess geht in 3´- 5´Richtung vor.

Nachdem alle Zyklen durchlaufen sind, erfolgte ein Abschluss der Polymerisationen bei 72 ° C für 4 Minuten.

Anschließend kühlte der Thermocycler auf 4 ° C runter, um jegliche Aktivität von Primern und Enzymen zu verhindern.

Um ein Verdunsten während der verschiedenen Schritte zu vermeiden, verfügte der Thermocycler über einen beheizbaren Deckel, der auf 110 ° C aufgeheizt wurde.

Für die AFP PCR wurde eine nested PCR durchgeführt. Hierzu wurden nach Durchführung von AFP 1 5µl des erhaltenen PCR Produktes entnommen und hierzu 0,5µl dNTP, 2,5µl PCR-Puffer, 0,5µl Taq-Polymerase, 15,5µl destilliertes Wasser sowie je 0,5µl der AFP 2 Primer (Sense und Antisense) pipettiert. Anschließend erfolgte die PCR dann nach dem untenstehenden Schema.

Bei jeder PCR wurde zudem Wasser anstelle der cDNA als Kontrolle eingesetzt.

#### GAPDH PCR:

Verwendete Primer:

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

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

Länge des PCR – Produkts: 593 bp

---

Zyklus – Schritte:

1.) Denaturierung:	60 Sekunden	}	Zyklus – Zahl: 35
2.) Annealing:	62 ° C für 60 Sekunden		
3.) Extension:	60 Sekunden		

CK 18 PCR:

Verwendete Primer:

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

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

Länge des PCR – Produkts: 518 bp

Zyklus – Schritte:

1.) Denaturierung:	60 Sekunden	}	Zyklus – Zahl: 40
2.) Annealing:	62 ° C für 60 Sekunden		
3.) Extension:	60 Sekunden		

CK 19 PCR:

Verwendete Primer:

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

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

---

Länge des PCR – Produkts: 261 bp

Zyklus – Schritte:

1.) Denaturierung:	60 Sekunden	}	Zyklus – Zahl: 40
2.) Annealing:	65 ° C für 60 Sekunden		
3.) Extension:	60 Sekunden		

Albumin PCR:

Verwendete Primer:

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

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

Länge des PCR – Produkts: 416 bp

Zyklus – Schritte:

1.) Denaturierung:	60 Sekunden	}	Zyklus – Zahl: 35
2.) Annealing:	57 ° C für 60 Sekunden		
3.) Extension:	60 Sekunden		

AFP – PCR:

1. Zyklus:

---

Verwendete Primer:

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

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

Zyklus – Schritte:

1.) Denaturierung:	60 Sekunden	}	Zyklus – Zahl: 35
2.) Annealing:	55 ° C für 60 Sekunden		
3.) Extension:	60 Sekunden		

2. Zyklus:

Verwendete Primer:

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

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

Länge des PCR – Produkts: 619 bp

Zyklus – Schritte:

1.) Denaturierung:	60 Sekunden	}	Zyklus – Zahl: 30
2.) Annealing:	60 ° C für 60 Sekunden		
3.) Extension:	60 Sekunden		

---

### ***3.14 Agarose - Gel – Elektrophorese***

Hierfür wurden Elektrophorese Artikel von Life Fermentas verwendet. Die PCR – Produkte wurden 1:6 mit der 6 x Loading Dye Solution verdünnt. Durch das enthaltene Ethylendiamintetraacetat (EDTA) wurden die vorhandenen Enzyme inhibiert. Zudem wurde mit dem ebenfalls enthaltenen Glycerol verhindert, dass die Proben im Puffer wegdiffundieren und nicht das Gel passieren. Für die Herstellung eines 1,5%-igen Gels wurden in 150 ml 0,5 % TAE – Puffer 2,25g Agarose hinzugegeben und die Suspension kurz in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach der Abkühlung bei Raumtemperatur auf ca. 50 ° C wurden 8 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert. Das Ethidiumbromid bindet sich sehr gut an die DNA und hat eine fluoreszierende Eigenschaft. Das Gel wurde in eine Kammer gegossen, indem sich ein Kamm mit 40 Vertiefungen befand. Beim Aushärten entstanden so 40 Taschen im Gel für das Aufnehmen der zu analysierenden Proben.

Sobald das Gel nach einer halben Stunde bei Raumtemperatur ausgehärtet war, wurde es in die Elektrophorese-Schale überführt. Diese war mit 0,5 % TAE – Puffer gefüllt. In die Taschen des Gels wurden je 10 µl der Probe pipettiert. Ein Marker, die 100 bp DNA Ladder, wurde in die randständigen Taschen pipettiert. Die angelegte Spannung betrug ca. 100 V und der gewählte Strom 100 mA. Nach ungefähr 80 Minuten waren die Proben im Gel soweit gelaufen, dass sie sich genügend aufgetrennt hatten. In einer UV – Dunkelkammer konnten bei einer Wellenlänge von 312 nm durch das Ethidiumbromid die Banden sichtbar gemacht sowie mit einer Kamera fotografiert werden.

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Übersicht über die Gewinnung der Ergebnisse

Der Versuchsaufbau dieser Forschungsarbeit enthielt eine Kokultivierung von MSC mit Hepatozyten über einen Zeitraum von 1, 2 und 3 Wochen. Die Kultivierung fand jeweils in Wellplatten unter identischen Bedingungen statt. Die Arbeit sah eine molekularbiologische Untersuchung der eingesetzten Zellen nach dem jeweiligen Zeitraum vor, um die MSCs auf eine leberspezifische Genexpression zu untersuchen. Um die Zellen getrennt voneinander zu untersuchen, musste man die Zellen nach der Kokultivierung trennen können. Hierfür diente der Einsatz GFP+ MSCs zusammen mit GFP- Hepatozyten. In der Kokultur befanden sich somit MSCs, die GFP-positiv waren und nach dem abgelaufenen Versuch mit Hilfe dieser Eigenschaft identifiziert werden konnten.

Nachdem die Zellen aus den Wellplatten geerntet wurden fand eine Auftrennung der Zellen nach Größe und Granularität sowie Fluoreszenzverhalten statt. Dabei wurden zunächst die lebenden Zellen, anhand der Größe mittels forward scatter sowie der Granularität mittels side scatter, von Zellfragmenten und anderen Artefakten selektiert. Aus der Gruppe der lebenden Zellen wurden dann mittels der Fluoreszenz die GFP+ Zellen ermittelt. Aus diesen GFP+ wurden anschließend die hochpositiven Zellen ausgewählt, um hier die GFP+ MSCs zu gewinnen und mögliche Artefakte wie kontaminierte Zellen zu entfernen. Als letzter Schritt wurden dann die so ermittelten GFP-positiven MSCs mit der höchstmöglichen Reinheit sortiert. Auf den beigefügten Bildern erkennt man die Ergebnisse, die die FACS-Analyse ergeben hat und die festgelegten Grenzen für die Sortierung (Abb. 2-4).

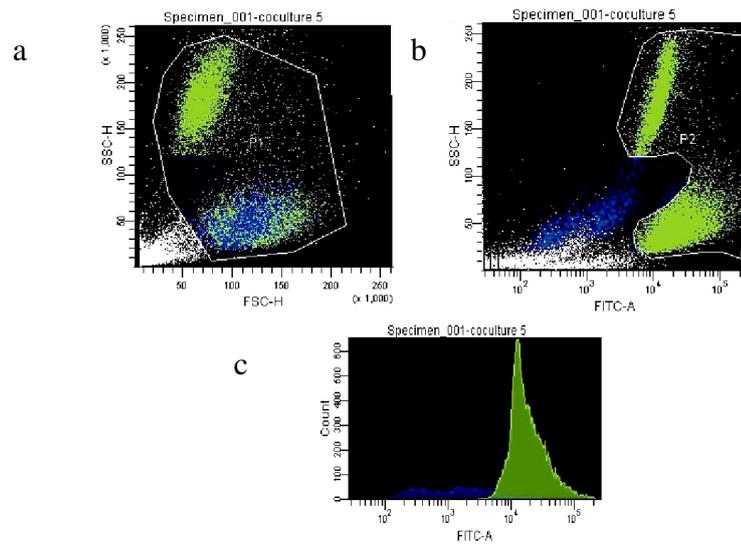


Abb. 2: Darstellung der FACS-Ergebnisse der Kokultur nach 1 Woche

a) lebende Zellen wurden anhand ihrer Größe und Granularität von toten Zellen über ein gating getrennt (P1); b) GFP-positive Zellen wurden aus P1 als eine Zellpopulation getrennt (P2); c) aus P2 wurden nochmals alle nicht hoch-positiven GFP+ Zellen abgetrennt und als GFP+ gesortet. Reproduzierbare FACS Ergebnisse fanden sich bei insgesamt 3 durchgeführten Versuchen

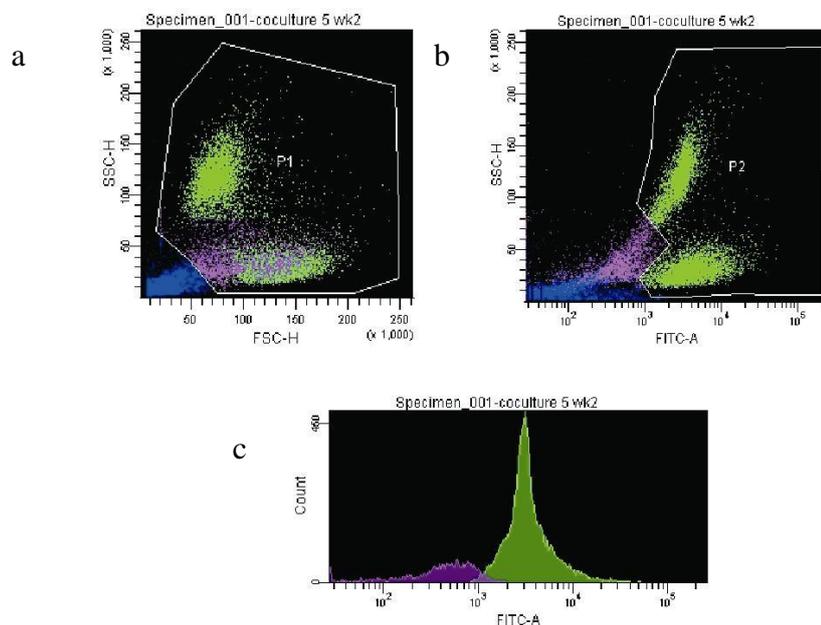


Abb. 3: Darstellung der FACS-Ergebnisse der Kokultur nach 2 Wochen

a) lebende Zellen wurden anhand ihrer Größe und Granularität von toten Zellen über ein gating getrennt (P1); b) GFP-positive Zellen wurden aus P1 als eine Zellpopulation getrennt (P2); c) aus P2 wurden nochmals alle nicht hoch-positiven GFP+ Zellen abgetrennt und als GFP+ gesortet. Reproduzierbare FACS Ergebnisse fanden sich bei insgesamt 3 durchgeführten Versuchen

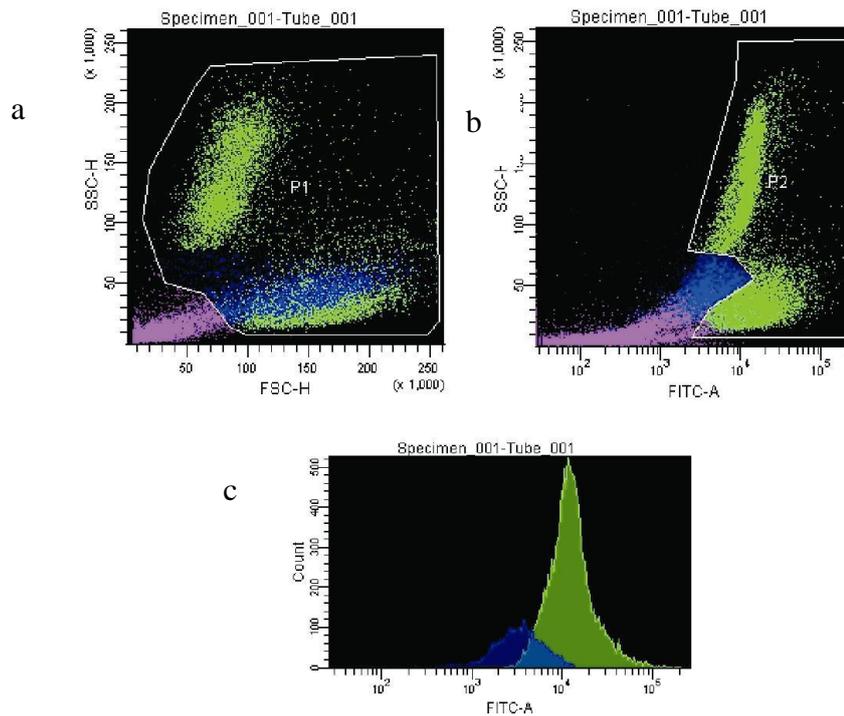


Abb. 4: Darstellung der FACS-Ergebnisse der Kokultur nach 3 Wochen

a) lebende Zellen wurden anhand ihrer Größe und Granularität von toten Zellen über ein gating getrennt (P1); b) GFP-positive Zellen wurden aus P1 als eine Zellpopulation getrennt (P2); c) aus P2 wurden nochmals alle nicht hoch-positiven GFP+ Zellen abgetrennt und als GFP+ gesortet. Reproduzierbare FACS Ergebnisse fanden sich bei insgesamt 3 durchgeführten Versuchen

Durch die Durchflußzytometrie erhielt man die Trennung der Zellen in GFP-positiv und GFP-negativ, dabei ergaben sich folgende Zellzählungen:

	Anzahl der eingesäten Zellen für jede Woche	Woche 1	Prozent der eingesäten Zellen	Woche 2	Prozent der eingesäten Zellen	Woche 3	Prozent der eingesäten Zellen
GFP- Zellen	1.200.000	401.206	33,43%	2.400.000	200,00%	1.530.000	128%
GFP+ Zellen	1.800.000	1.546.489	85,92%	2.700.000	150,00%	1.700.000	94%
Gesamt	3.000.000	1.947.695	64,92%	5.100.000	170,00%	3.230.000	107,67%

*Abb. 5: Ergebnisse der FACS  
Sortierung*

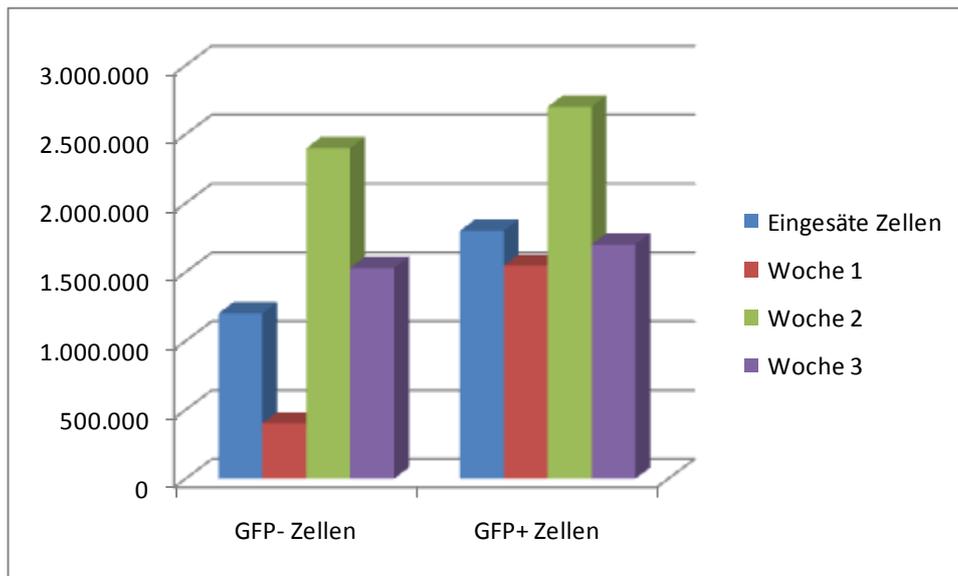
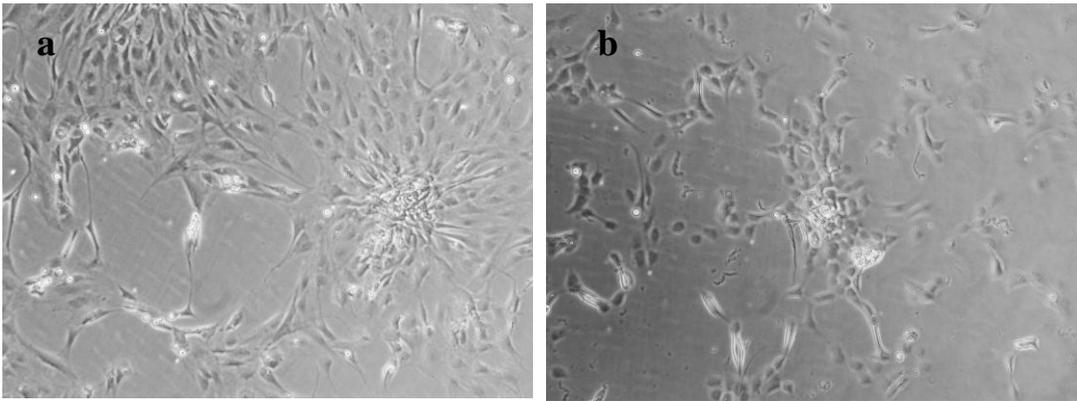


Abb. 6: Ergebnisse der FACS Sortierung als Säulendiagramm

## 4.2 MSC Monokultur

Bei dieser Arbeit wurden MSC über den Versuchszeitraum von 3 Wochen auch in einer Monokultur gehalten und nach 1, 2 sowie 3 Wochen untersucht. Dabei wurden sie wie die Kokulturen unter identischen Bedingungen mit dem gleichen Kulturmedium kultiviert. In diesem Versuchsaufbau stellten sie die sogenannte Negativkontrolle dar.

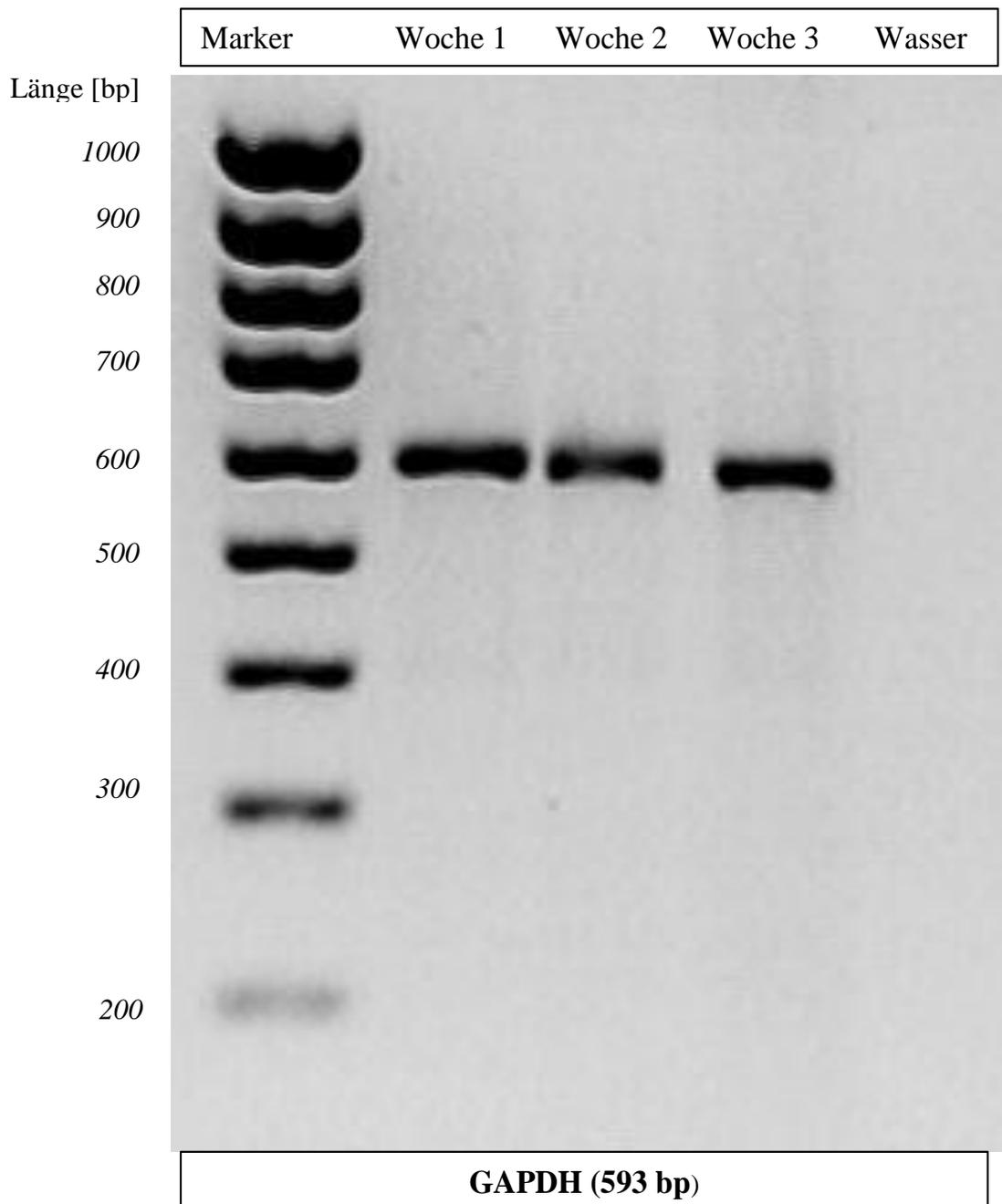
Pro Well wurden jeweils  $9 \times 10^4$  Zellen eingesetzt. Die Zellen entstammten einer Lewis Ratte P 14. MSCs bilden in vitro eine typische, spindelförmige Form. Bereits nach 3 Tagen waren die Wells nahezu konfluent (Abb. 7a). Unter den eingesetzten Versuchsbedingungen wurden die Zellen innerhalb der 3 Wochen Inkubationszeit gedrängter in ihrer Morphologie, bildeten eher Cluster als Konfluenz und zeigten keine Proliferation (Abb. 7b).



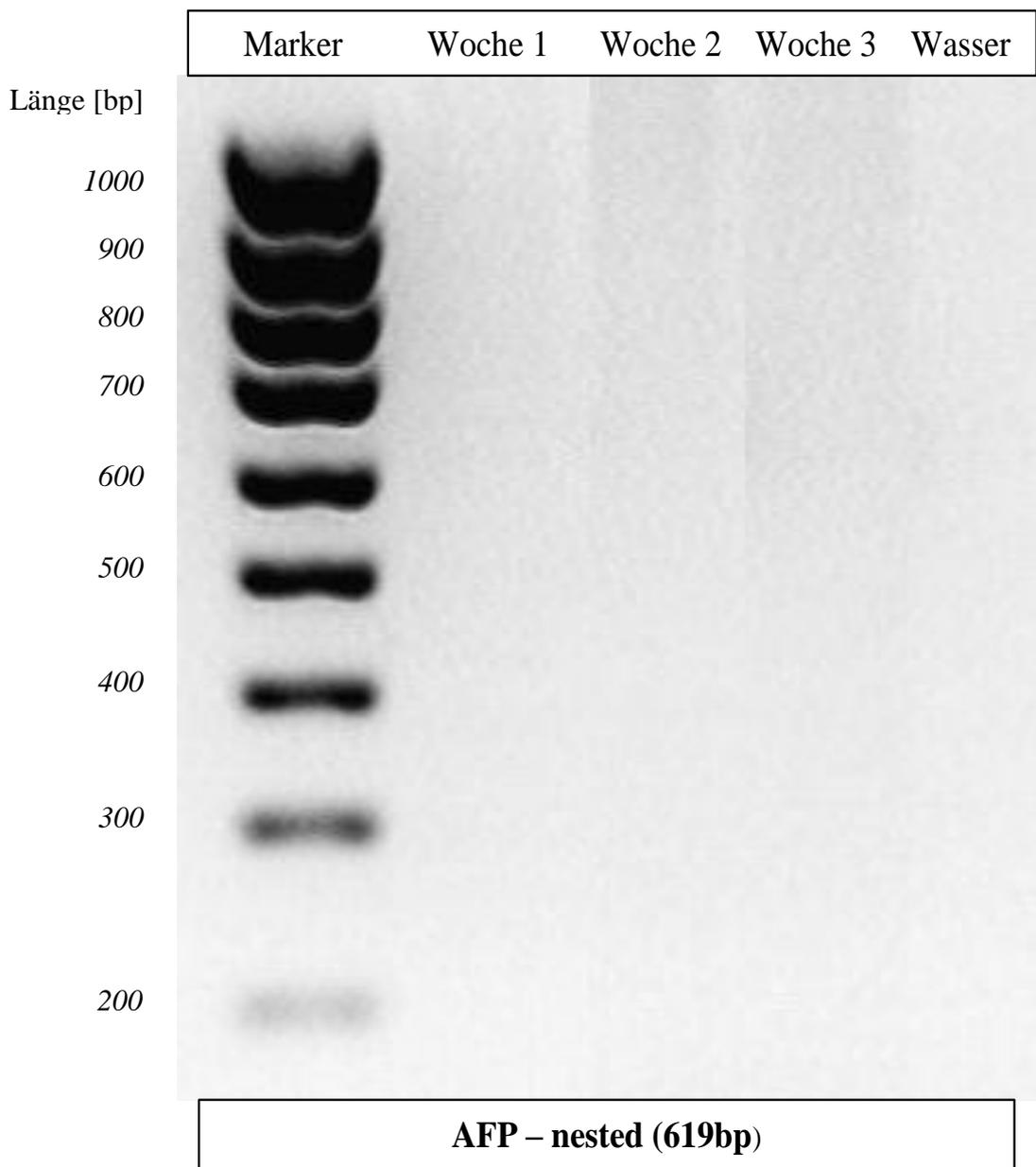
*Abb. 7: Morphologie und Konfluenz der rMSC nach 1 Woche (a) und nach 3 Wochen (b). Kultur im angewendeten Kulturmedium, aufgenommen mit Phasenkontrast. Vergrößerung: x100*

#### **4.2.1 PCR Ergebnisse**

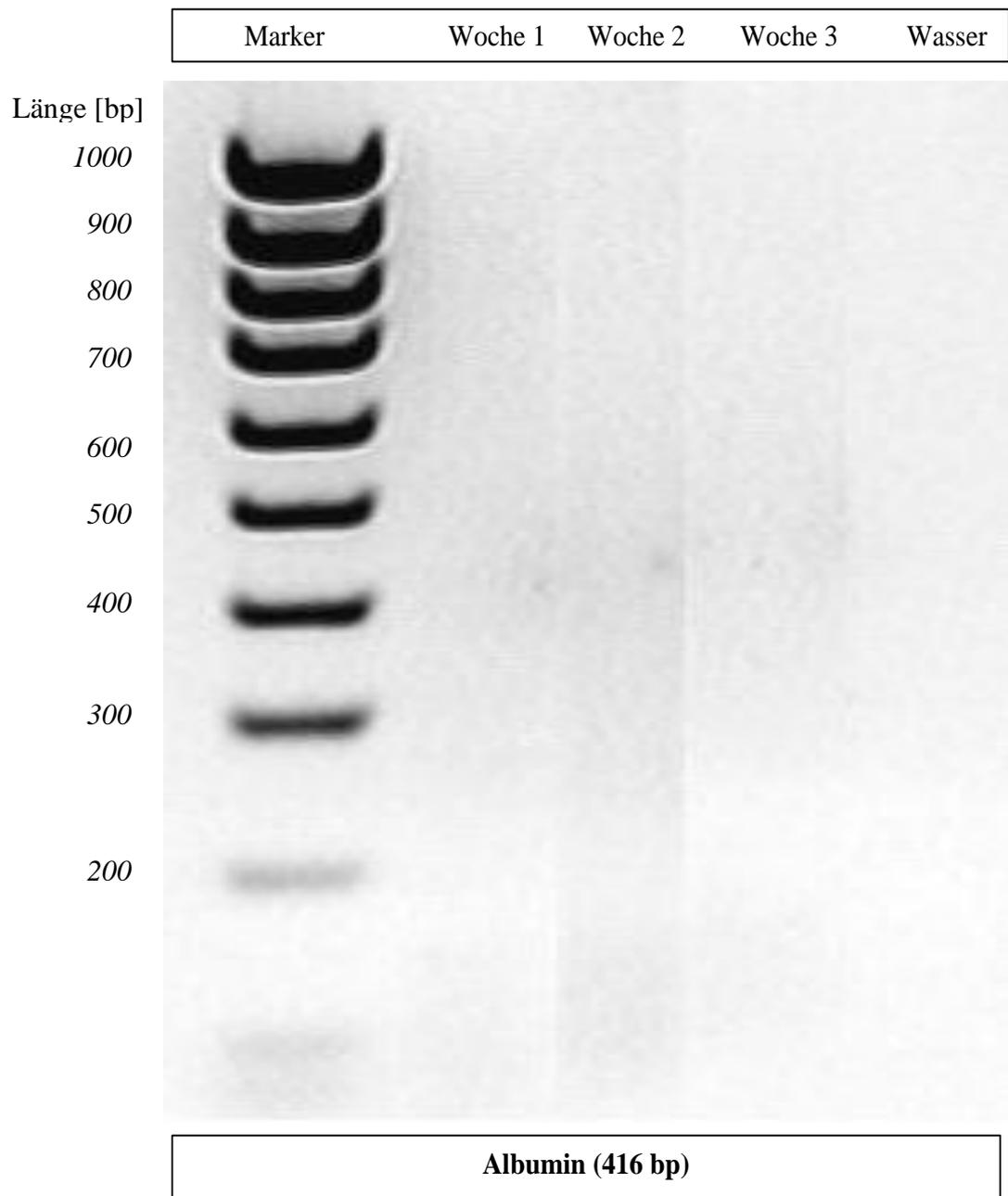
Nach dem Ernten der Zellen und der RNA – Aufbereitung wurde diese in die komplementäre cDNA umgewandelt. Diese wurde dann mit der Technik der PCR auf verschiedene, in hepatozytären Zellen exprimierte Gene mit ausgewählten Primern untersucht und mit Hilfe der Gelelektrophorese dargestellt (Abb. 8-12).



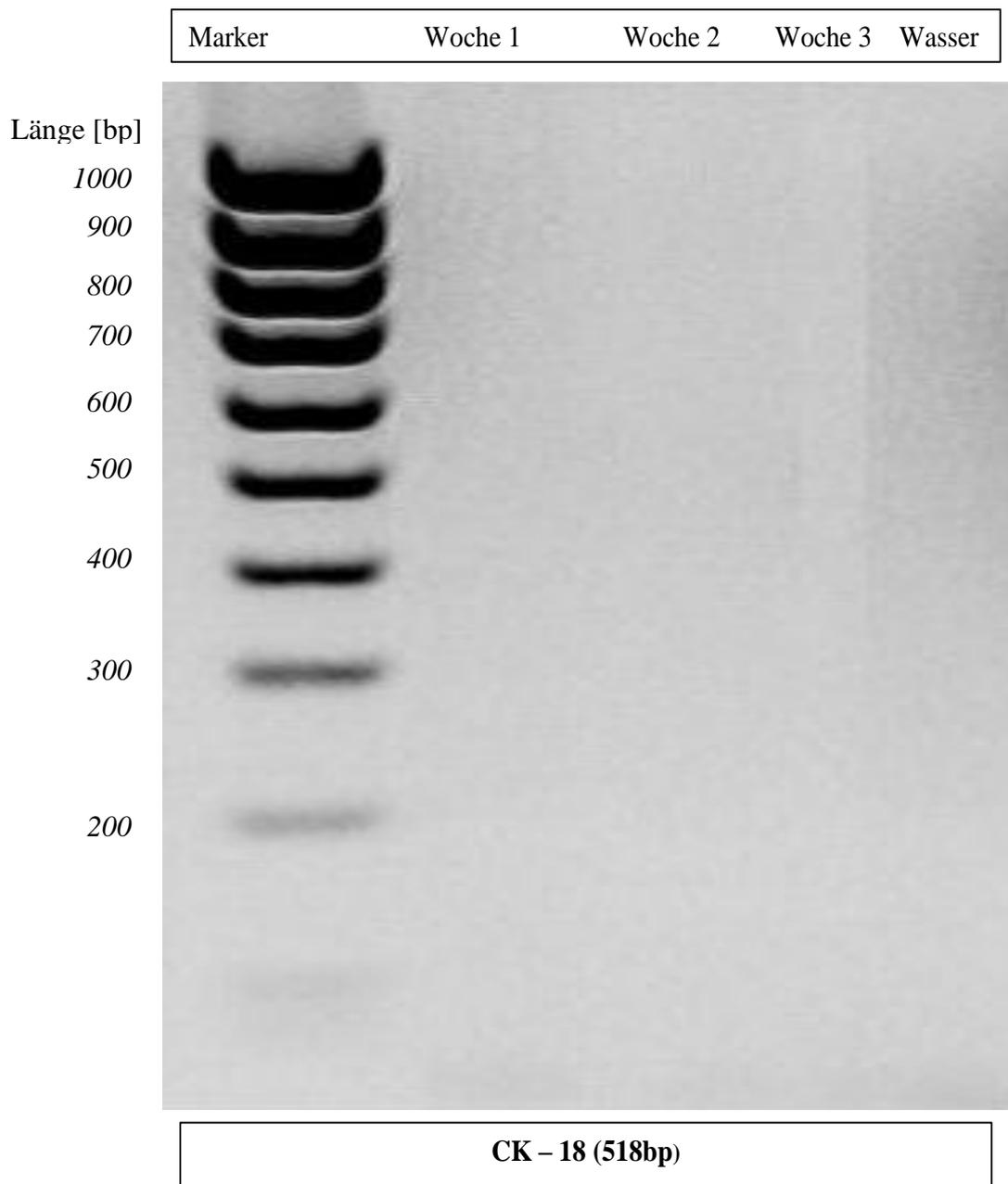
*Abb. 8: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für das Housekeepinggen Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Länge 593bp der rMSC – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



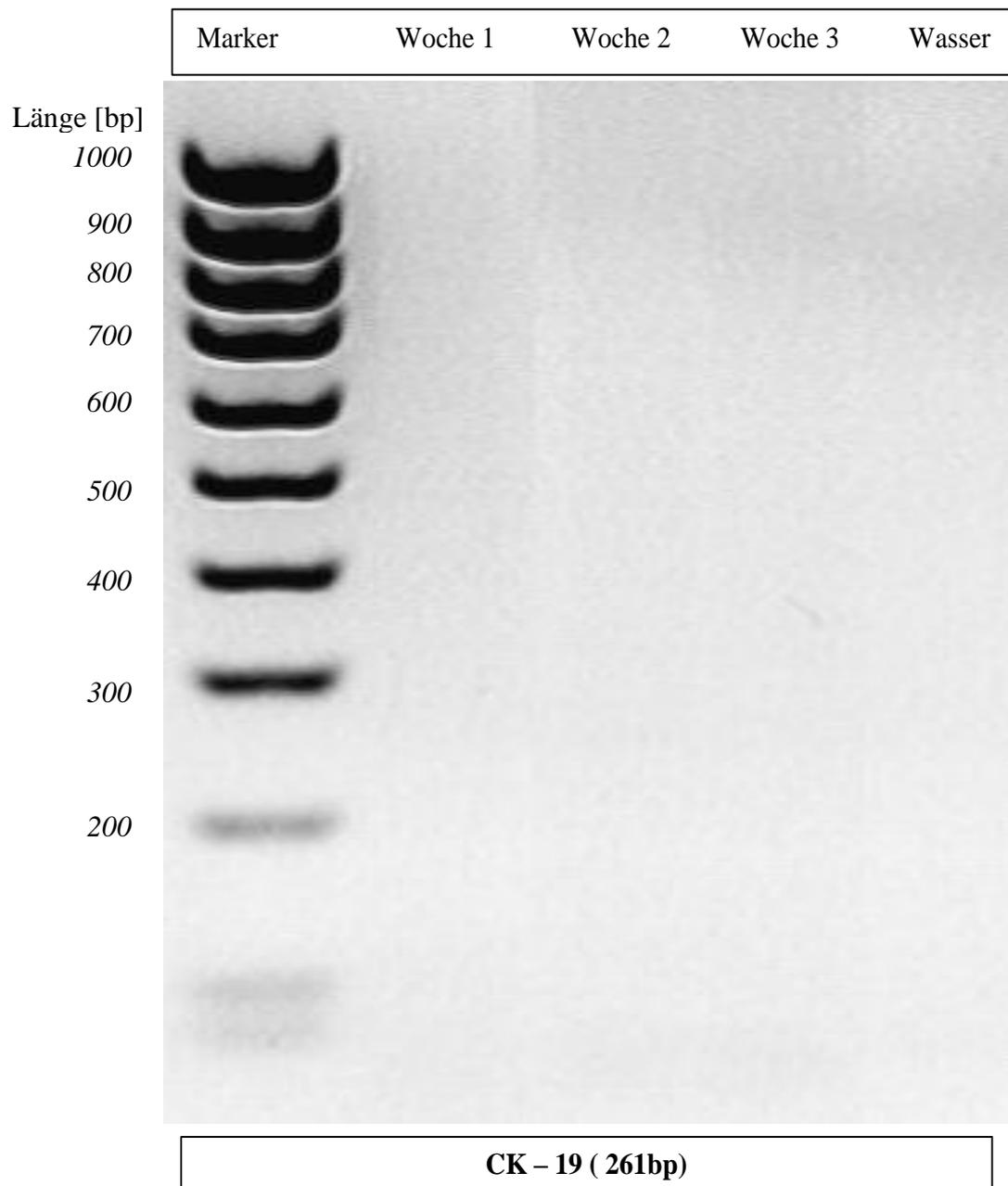
*Abb. 9: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker AlphaFetoProtein (AFP) der Länge 619bp der rMSC – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 10: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker Albumin der Länge 416bp der rMSC – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 11: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker Cytokeratin 18 (CK 18) der Länge 518bp der rMSC – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 12: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker Cytokeratin 19(CK 19) der Länge 261bp der rMSC – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*

---

Die Gelelektrophorese erbrachte zwei Ergebnisse:

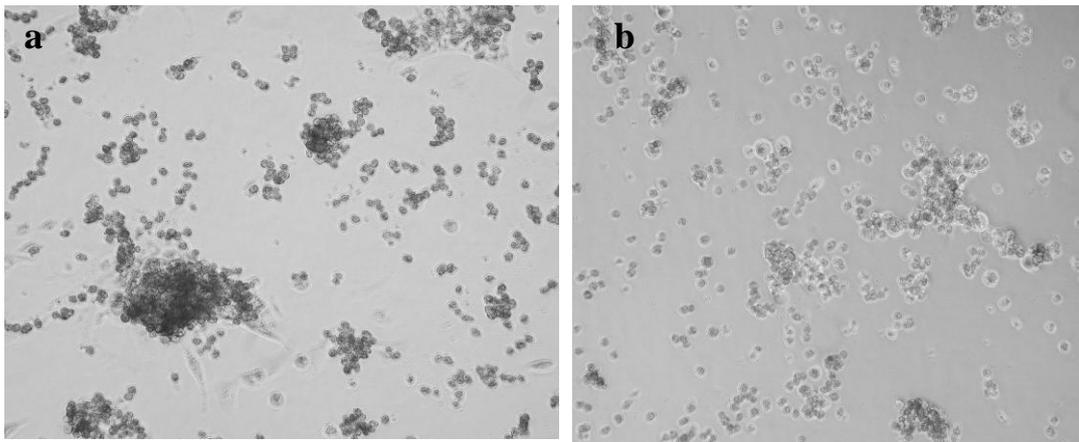
- 1.) Die rMSC waren zu jedem der 3 Untersuchungszeitpunkte positiv für das Housekeepinggen GAPDH (Abb. 8).
- 2.) Für die Hepatozytenmarker Albumin, AFP sowie CK – 18 und CK – 19 waren die rMSC durchgehend negativ (Abb. 9 – 12).

Mit Hilfe des sogenannten Housekeepinggen GAPDH, das universell und unspezifisch in jeder vitalen Zelle exprimiert wird und für die Glykolyse essentiell ist, kann nachgewiesen werden, dass in den molekularbiologischen Untersuchungsschritten Erbmateriale vorliegt. Es lagen also zu jedem Zeitpunkt vitale Zellen, rMSCs, vor, die dann auch weitergehenden Schritten zugeführt werden konnten. Die vier anderen Primer CK – 18, CK – 19, Albumin und AFP stehen dagegen für Proteine, die klassischerweise von Hepatozyten exprimiert werden. Für alle vier Marker waren die MSCs auf der RNA-Ebene negativ. Dieses Ergebnis zeigt, dass MSC auch mithilfe von Zytokinen, die bei anderen Zellen eine hepatozytäre Differenzierung induzieren, nicht in Hepatozyten differenziert werden können. Als Negativkontrolle wurde jeweils reines Wasser anstelle des cDNA-Templates in die PCR-Reaktion gegeben, diese Wasserkontrolle war bei allen fünf Ansätzen negativ (Abb. 8 – 12, jeweils rechter Bildrand) und zeigte eine nicht mit residueller DNA verunreinigte PCR-Reaktion.

### **4.3 Hepatozyten Monokultur**

Hepatozyten wurden frisch aus einer Sprague D. Ratte isoliert und sofort in die Wellplatten eingesetzt. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie in der Kokultur, somit diente die Monokultur der Hepatozyten als sogenannte Positivkontrolle.

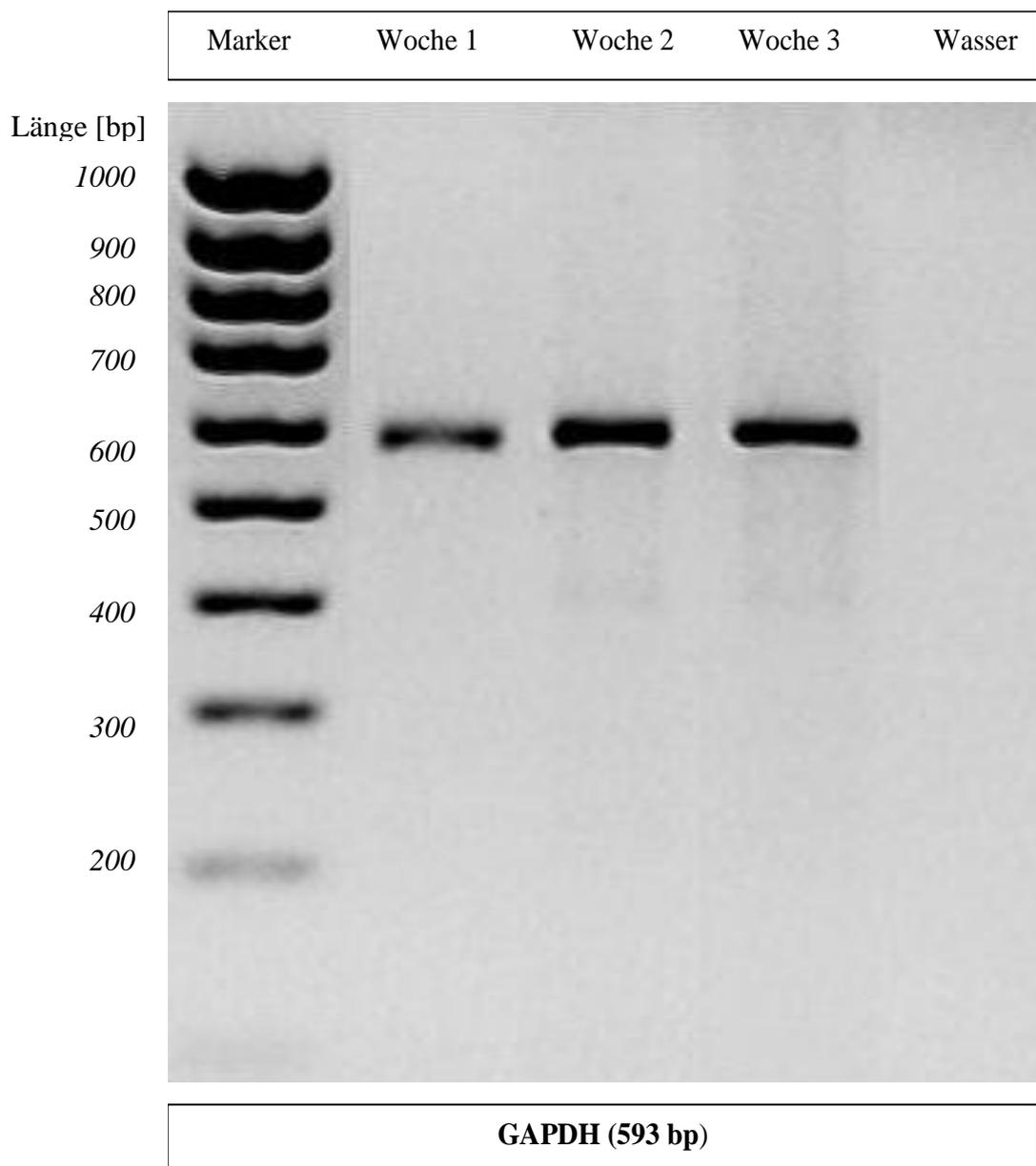
Im Lichtmikroskop begannen die Hepatozyten, eine runde Morphologie anzunehmen und lagerten sich zu Klumpen zusammen, besonders gut nach einer Woche erkennbar (Abb. 13a). Der Zellkern war typisch für Leberzellen relativ groß. Im zeitlichen Verlauf in Woche 2 und 3 nahm die Anzahl der überlebenden Zellen sichtbar ab (Abb. 13b).



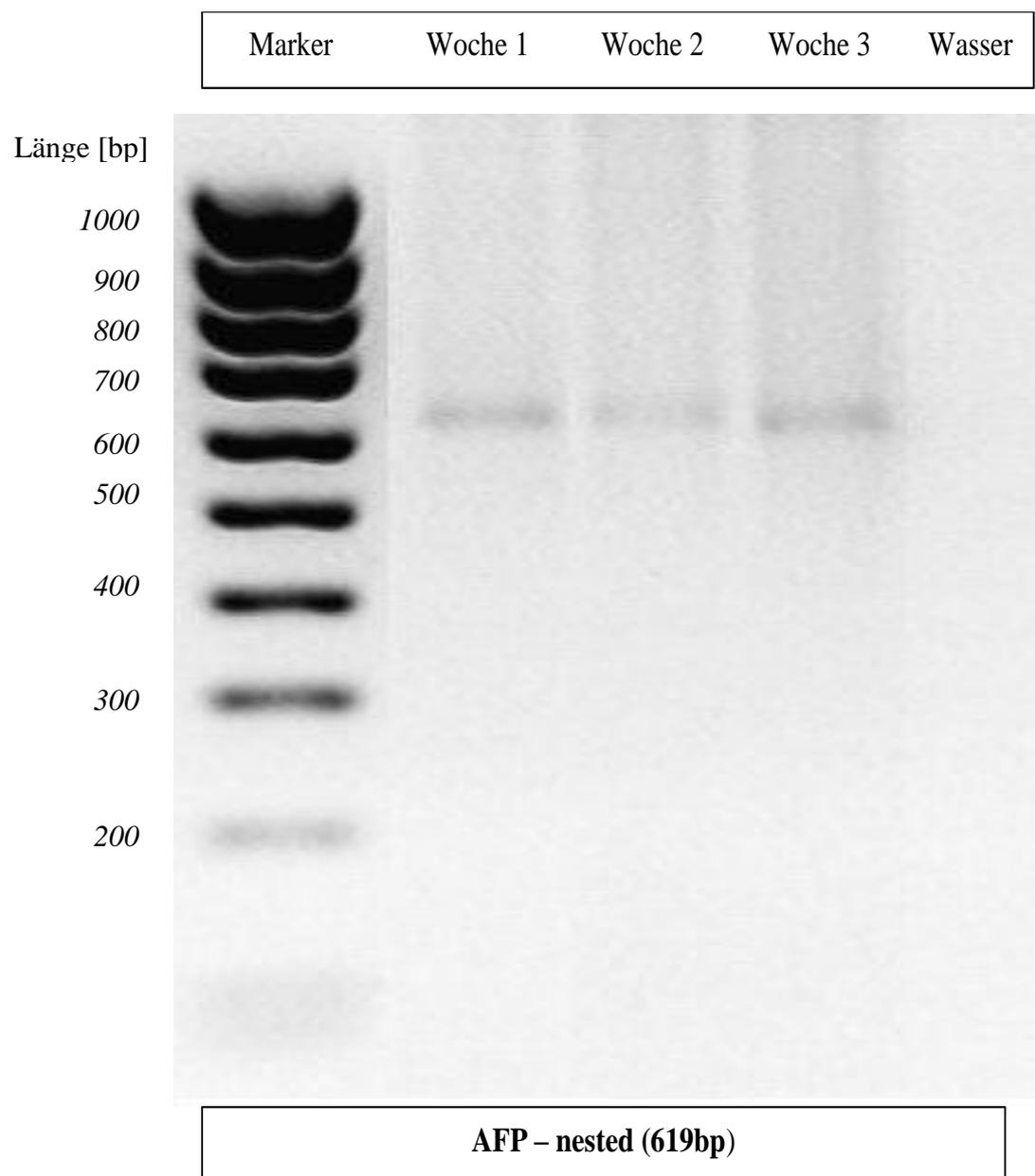
*Abb. 13: Morphologie der Hepatozyten als Positivkontrolle nach 1 Woche (a) und 3 Wochen (b). Aufgenommen mit Phasenkontrast. Vergrößerung:  $\times 100$*

#### **4.3.1 PCR Ergebnisse**

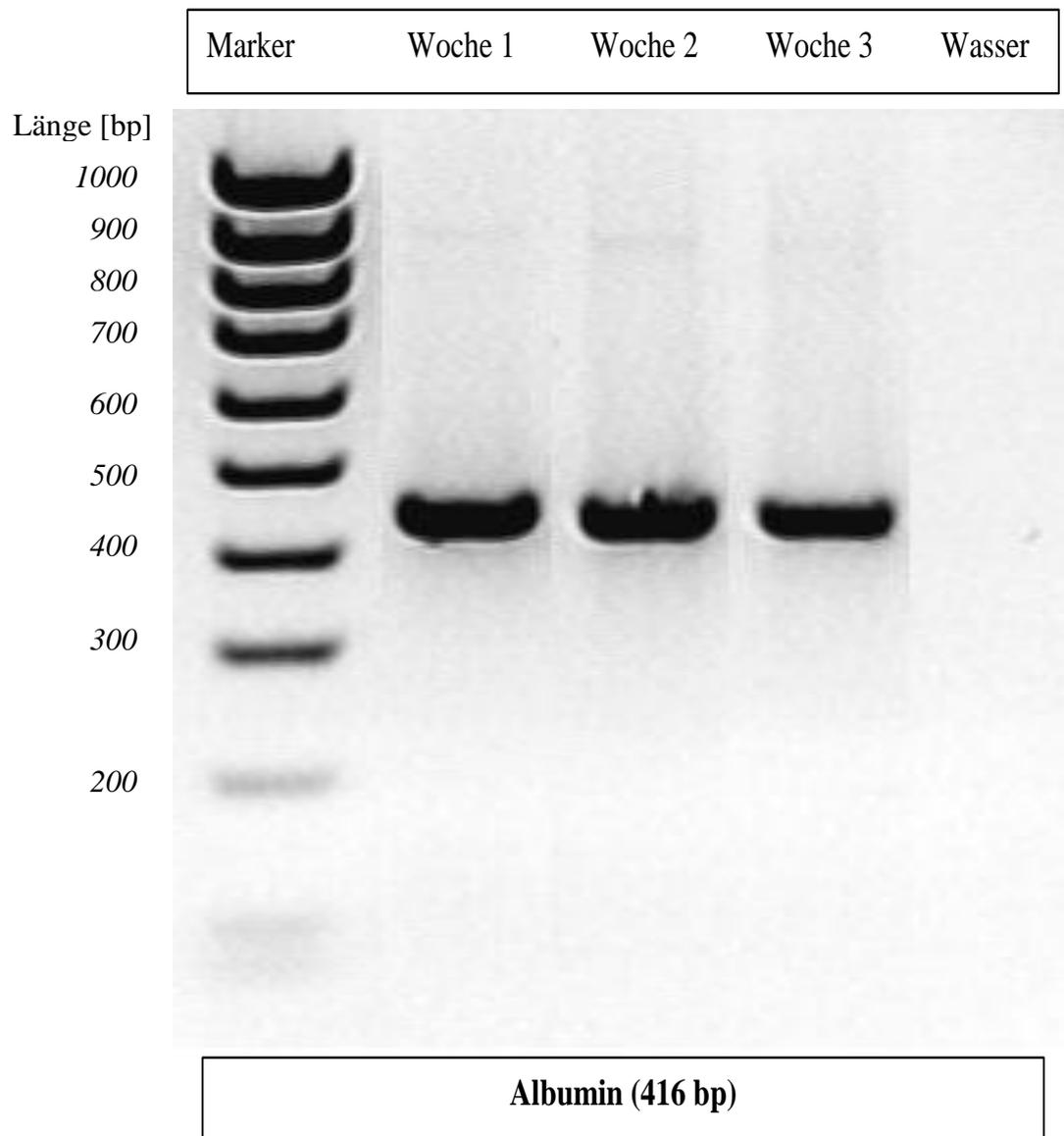
Unter identischen Bedingungen wie die Negativkontrolle wurden die Hepatozyten nach der Kultivierung geerntet und die cDNA mit den gleichen Primern und PCR – Programmen untersucht. Anschließend erfolgte die Darstellung auf einem Gel (Abb. 14-18).



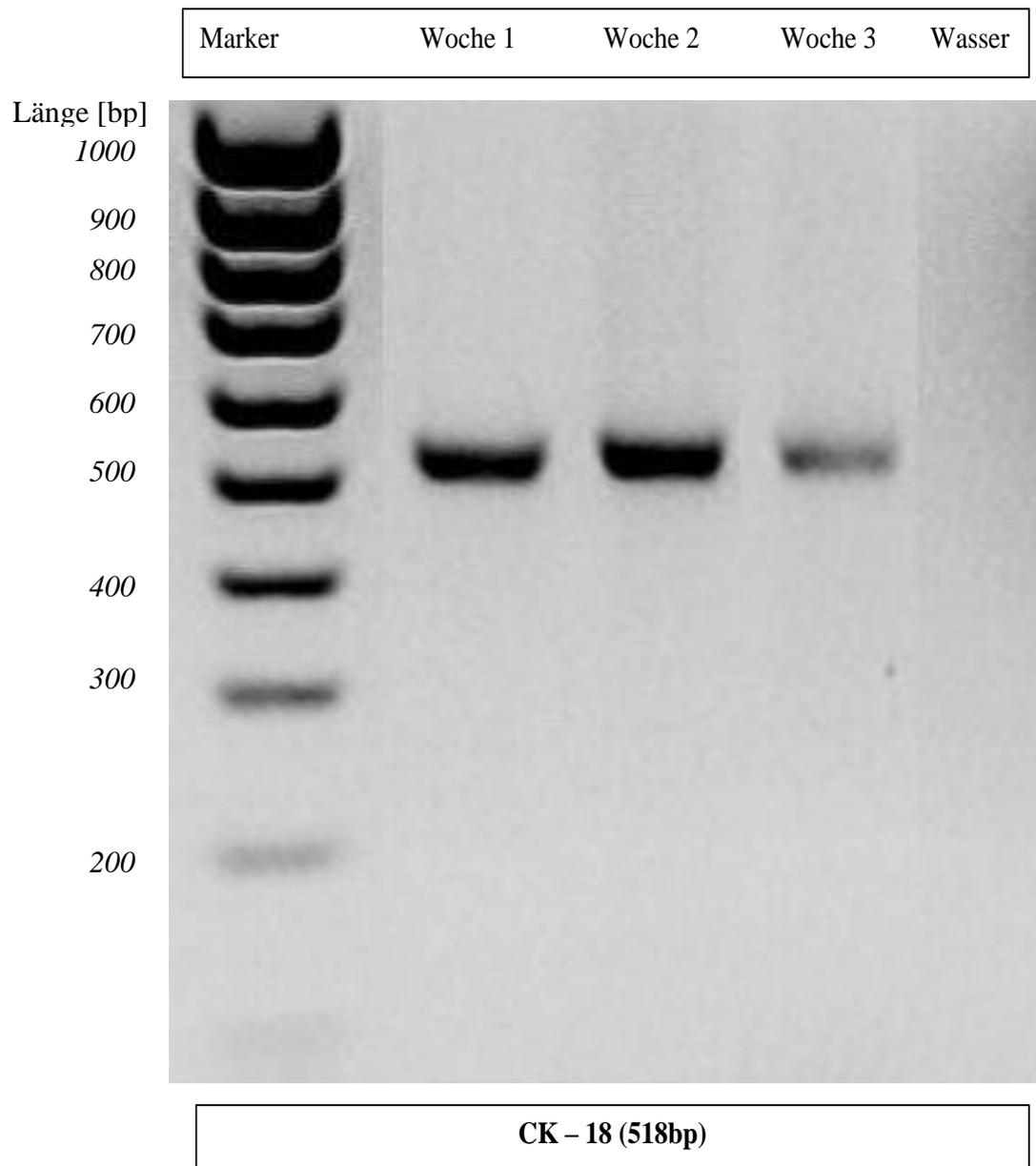
*Abb. 14: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für das Housekeepinggen Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Länge 593bp der Hepatozyten nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



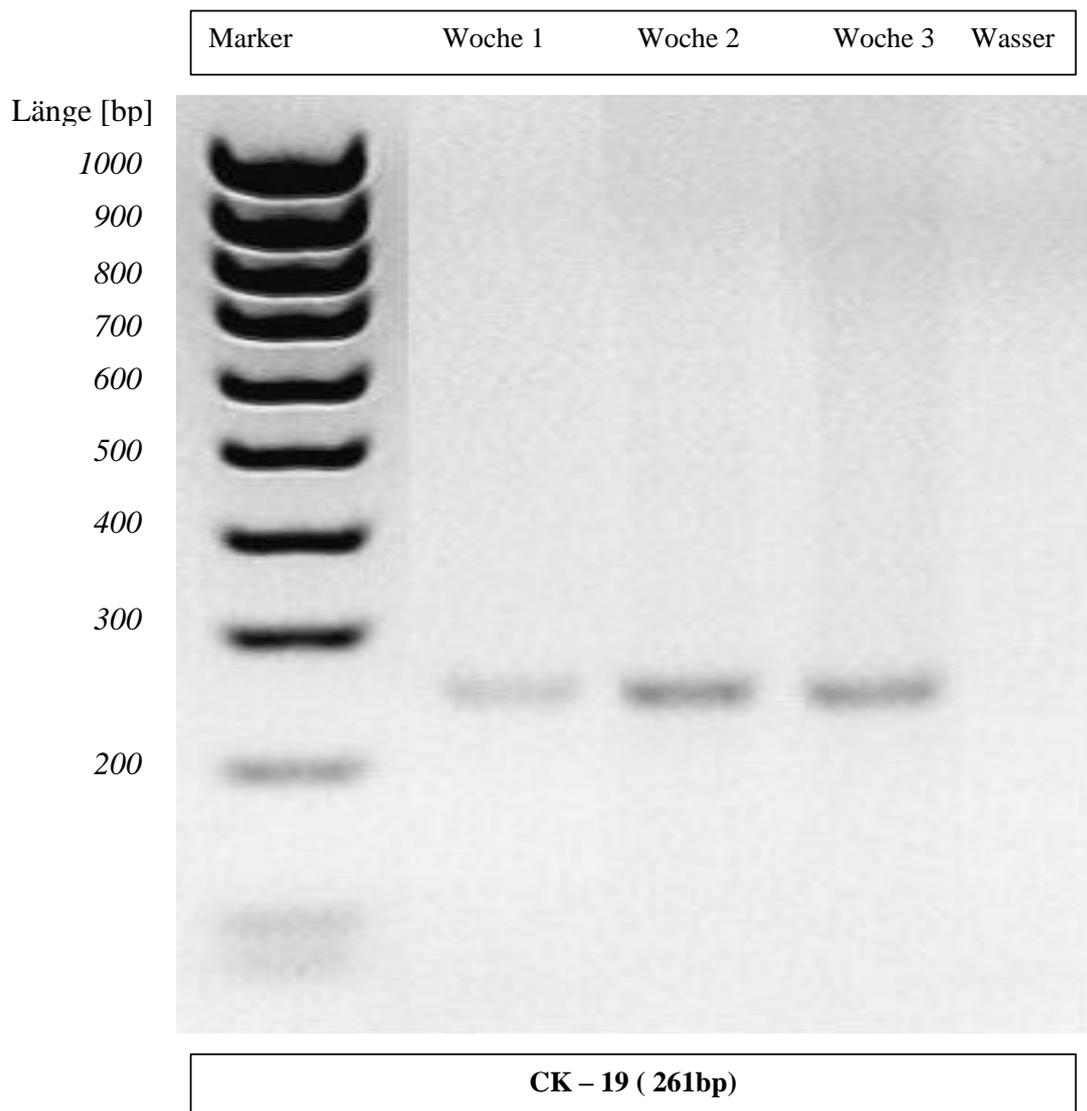
*Abb. 15: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker AlphaFetoProtein (AFP) der Länge 619bp der Hepatozyten – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 16: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker Albumin der Länge 416bp der Hepatozyten – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 17: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker Cytokeratin 18 (CK 18) der Länge 518bp der Hepatozyten – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 18: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker Cytokeratin 19(CK 19) der Länge 261bp der rMSC – Monokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*

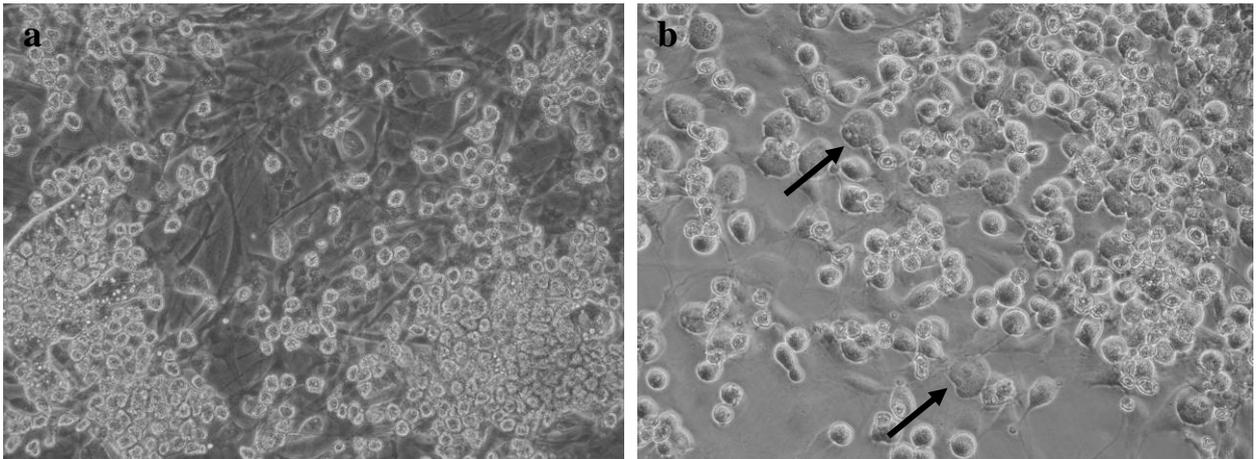
Auch für die Hepatozyten als Positivkontrolle ergab die PCR mit anschließender Gelauftragung mehrere Ergebnisse.

---

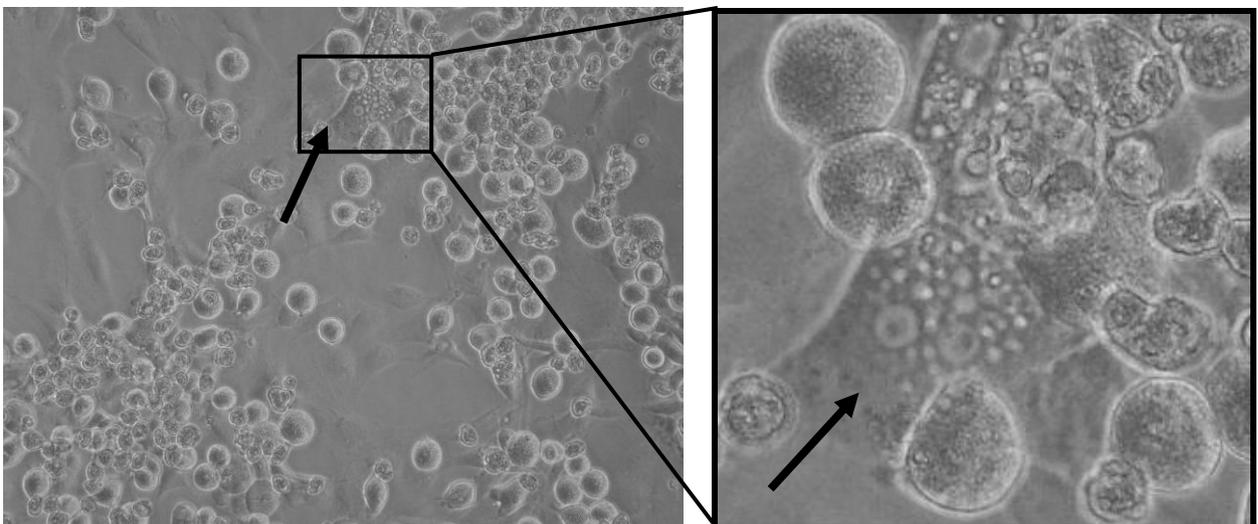
Wie schon bei den MSCs war auch hier durchgehend das Housekeepinggen GAPDH positiv (Abb. 14) – eine Grundvoraussetzung für den Nachweis von überlebenden Zellen war somit erfüllt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die vier eingesetzten Hepatozytenmarker allesamt über die drei Wochen positive Banden ergaben (Abb. 15 – 18). Zu jedem Zeitpunkt hatten die Zellen die für Leberzellen typischen Gene, die sogenannten Hepatozytenmarker, exprimiert. Dies war ein Beweis auf molekularbiologischer Ebene, dass mit Hepatozyten gearbeitet wurde. Somit konnte die Positivkontrolle verifiziert werden. Die jeweils durchgeführte Wasserkontrolle war stets negativ (Abb. 14 -18, jeweils rechter Bildrand).

#### **4.4 Kokultur**

Hauptgegenstand dieser Arbeit war eine Kokultivierung von Hepatozyten mit MSCs. Dabei wurden die Zellen zusammen in einem Well bis zu drei Wochen mit dem oben aufgeführten Differenzierungsmedium gehalten. Phasenkontrastmikroskopisch war zu erkennen, dass die spindelförmigen MSCs eine bodenbedeckende Schicht auf dem Substrat bildeten, während die Hepatozyten zu einer Klumpenbildung neigten (Abb. 19a). Bereits nach 2 Wochen waren binukleäre Zellen erkennbar (Abb. 19b, Pfeile), die nach 3 Wochen Inkubation in hepatozytärem Medium als große adhärenente binukleäre Zellen erkennbar waren (Abb. 20, Pfeil im Ausschnitt).



*Abb. 19: Kokultivierung von Hepatozyten und MSCs. a) Nach 1 Woche deutlich erkennbare spindelförmige MSCs neben sich in mehreren Zellhaufen organisierenden Hepatozyten. b) In der 2. Woche dann Auflockerung der Zellverbände, bereits binukleäre Zellen (Pfeile) erkennbar. Aufgenommen mit Phasenkontrast. Vergrößerung: x100.*

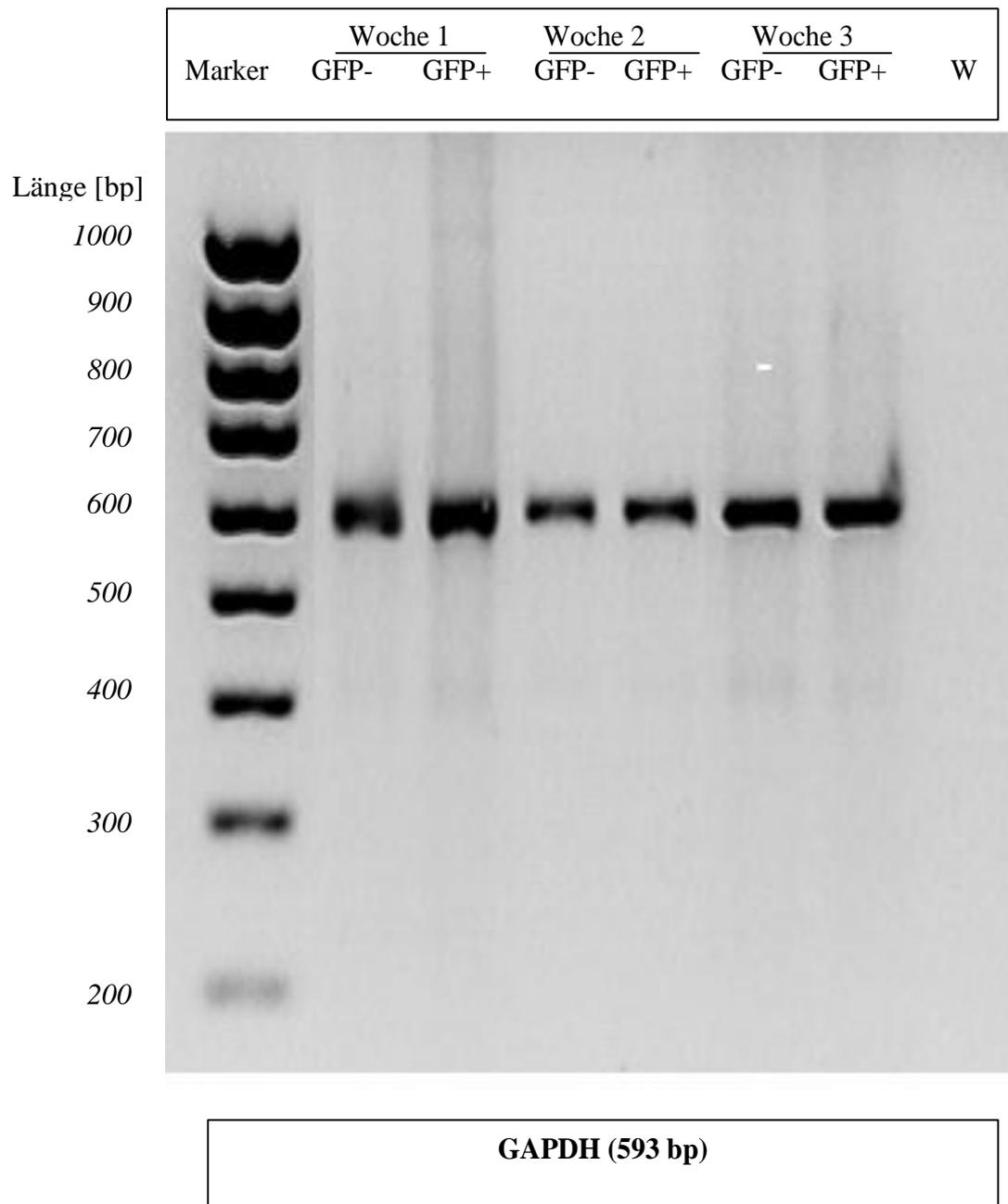


*Abb. 20: Phasenkontrastmikroskopisches Bild der Kokultur nach 3 Wochen. Erkennbare adhärenente binukleäre Zellen (Pfeil im Ausschnitt). Vergrößerung: x100.*

Nach dem erfolgten Herauslösen der Zellen aus den Wellplatten erfolgte mit der Durchflußzytometrie eine Auftrennung in GFP+ und GFP- Zellen. Untersucht werden sollte eine potentielle Umwandlung der MSCs in Hepatozyten, die durch eine neu auftretende Expression von Hepatozytenmarkern molekularbiologisch bewiesen werden sollte. Dabei behielten die differenzierenden MSCs die Expression des genomisch stabil integrierten GFP bei. Die Erwartung war daher, dass nach dem FACS-Sorting sich unter den GFP+ Zellen nicht nur reine MSCs befanden, sondern auch hepatozytär-differenzierte MSCs.

#### **4.4.1 PCR Ergebnisse**

Unter identischen Bedingungen wie bei den Kontrollen wurden von den GFP+ und GFP- Zellen RNA extrahiert, diese in cDNA umgewandelt und anschließend eine PCR mit den gleichen Primern und PCR – Programmen wie für die Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Anschließend wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt, um die Ergebnisse qualitativ darzustellen (Abb. 21 – 25).



*Abb. 21: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für das Housekeepinggen Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Länge 593bp für die sortierten GFP-negativen (GFP-) und GFP-positiven (GFP+) Zellen der Kokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*

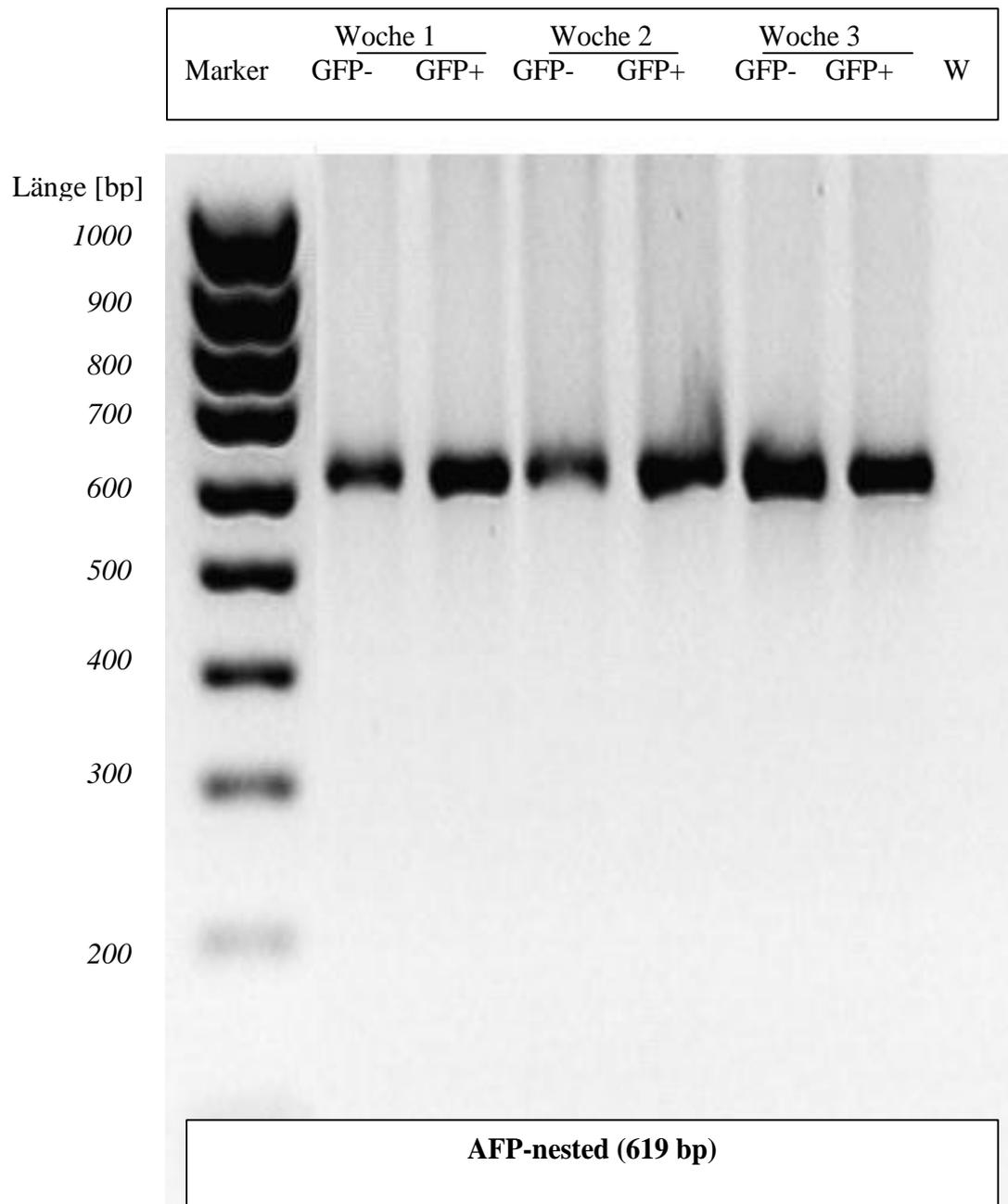
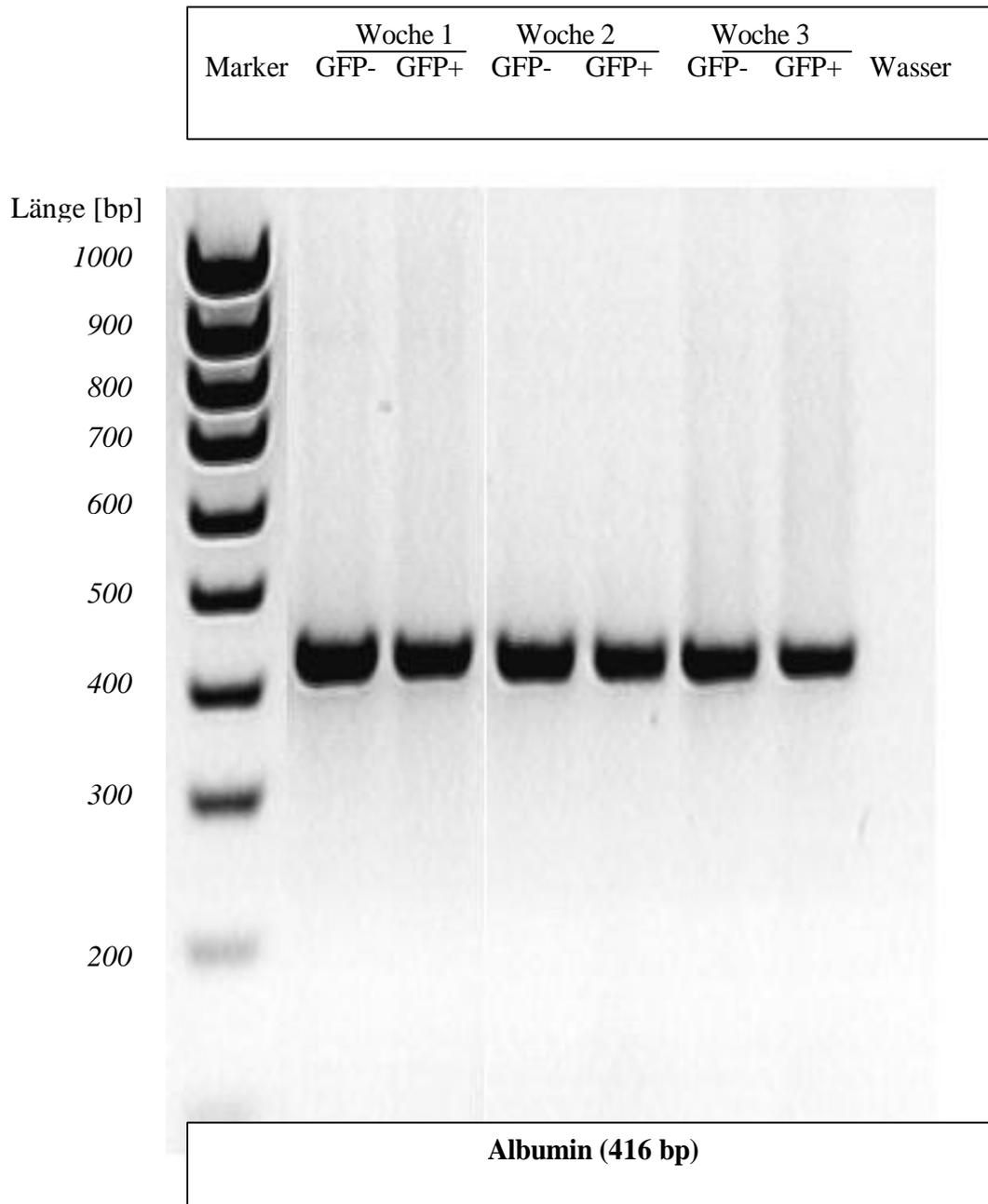
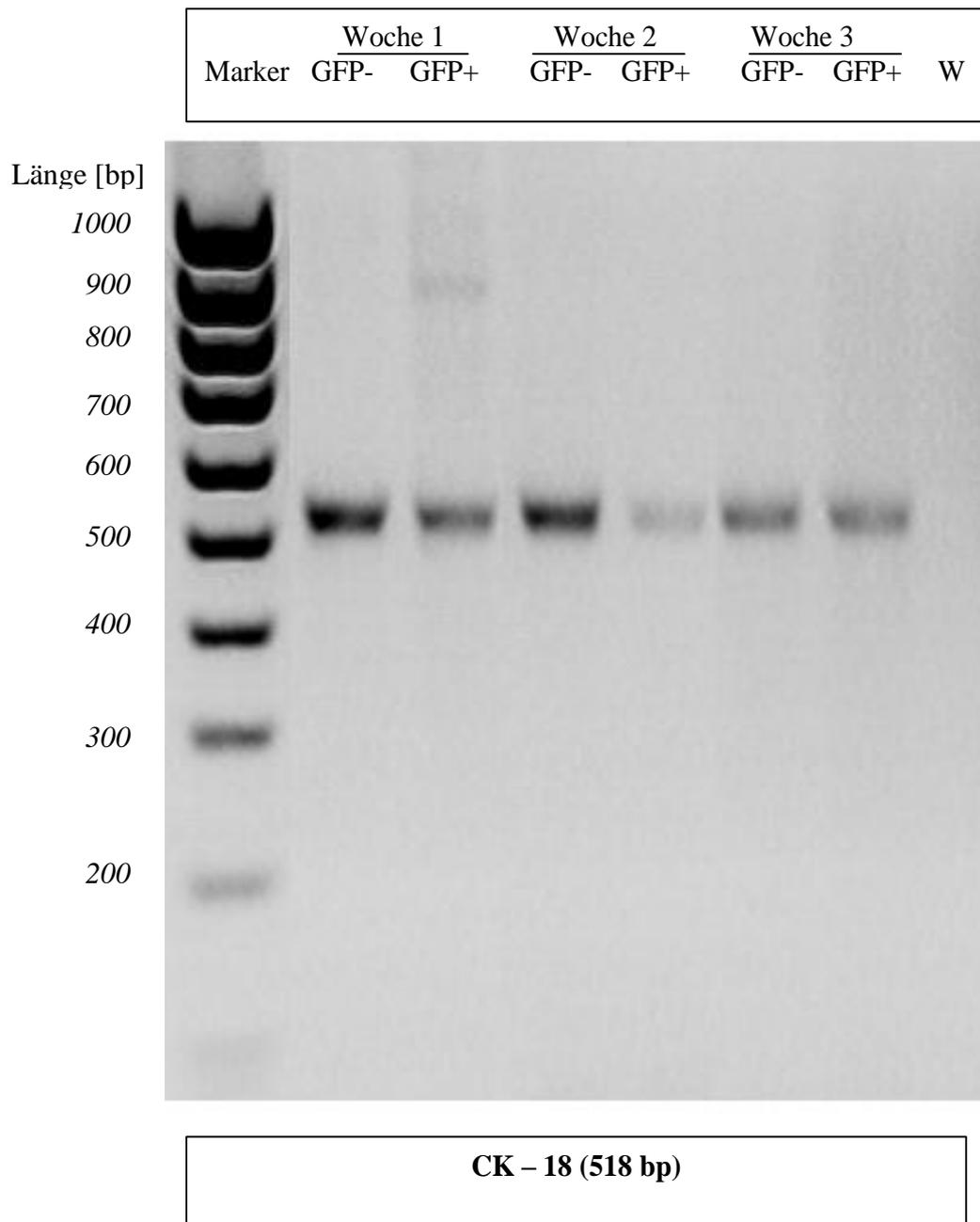


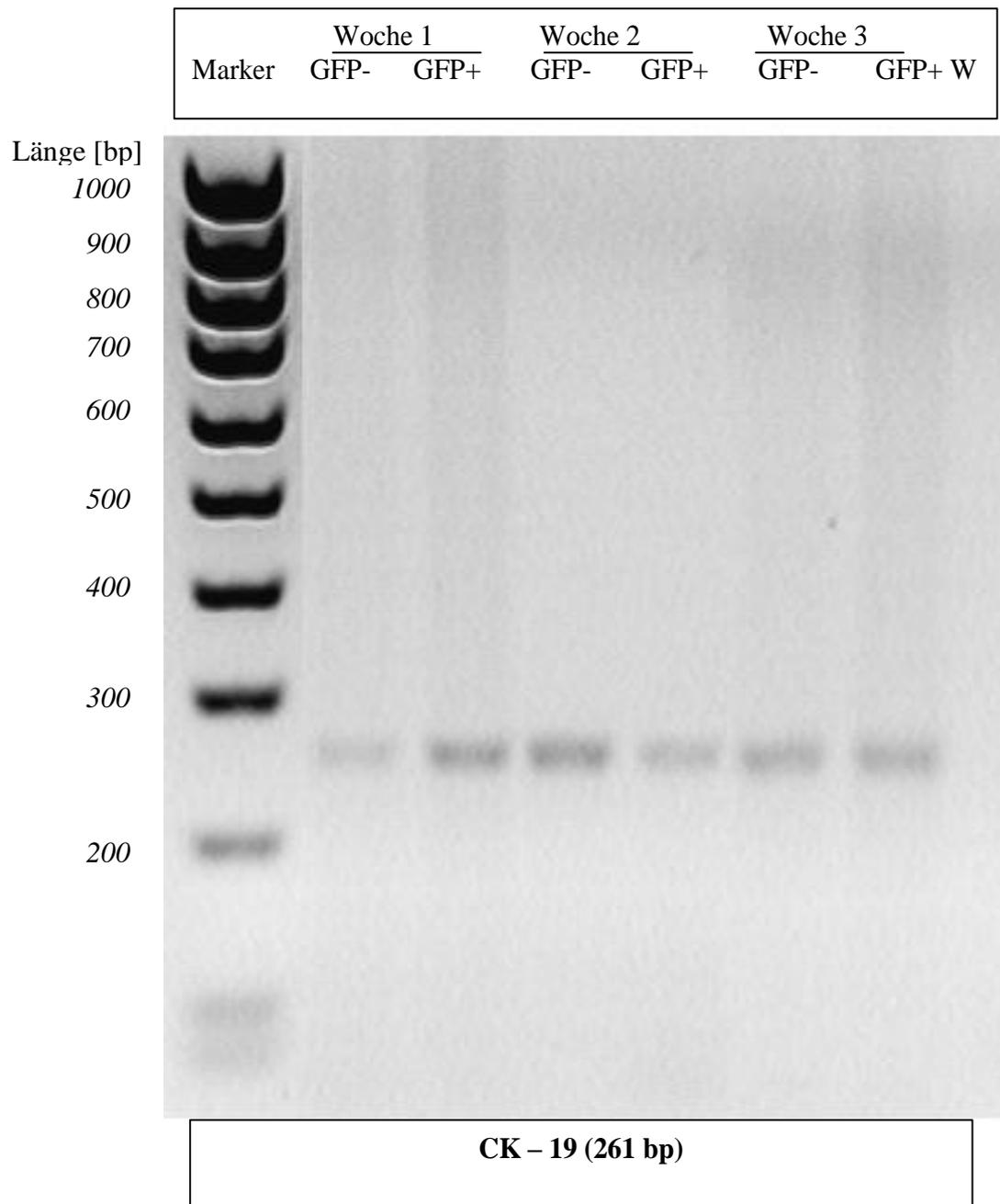
Abb. 22: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für den Hepatozytenmarker AlphaFetoProtein (AFP) für die sortierten GFP-negativen (GFP-) und GFP-positiven (GFP+) Zellen der Kokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.



*Abb. 23: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse mit einem Primer für den Hepatozytenmarker Albumin der Länge 416bp der Kokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen für die GFP-negativen (GFP-) und GFP-positiven (GFP+) Zellen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 24: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse mit einem Primer für den Hepatozytenmarker Cytokeratin 18 (CK 18) der Länge 518bp der Kokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen für die GFP-negativen (GFP-) und die GFP-positiven (GFP+) Zellen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*



*Abb. 25: Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse mit einem Primer für den Hepatozytenmarker Cytokeratin 19 (CK 19) der Länge 261bp der Kokultur nach 1, 2 sowie 3 Wochen für die GFP-negativen (GFP-) und für die GFP-positiven (GFP+) Zellen. Am linken Bildrand der Marker für das Gel (je 100bp) und rechts die negative Wasserkontrolle.*

---

Anhand der Gelelektrophorese ließen sich folgende PCR Ergebnisse für die Kokultur zeigen:

Die GAPDH PCR ergab positive Banden in allen drei Wochen in der Kokultur sowohl für die GFP+ als auch GFP- Zellen (Abb. 21), was ein Beweis für das Vorhandensein von umgeschriebener RNA in den Proben war. In den folgenden PCR Untersuchungen sämtlicher untersuchter hepatischer Gene (AFP, Albumin, CK - 18 und CK – 19) zeigten sich positive Banden über die gesamten drei Wochen sowohl für die GFP+ als auch für die GFP- Zellen (Abb. 22 – 25). Dabei zeigte sich bei CK – 18 in der 1. Woche eine auffällig stärkere Bande als in den folgenden Wochen, sowohl für die GFP+ als auch GFP- Zellen. Die Wasserkontrolle war jeweils negativ (Abb. 21 – 25, jeweils rechter Bildrand).

#### ***4.5 Zusammenfassung der gesamten Versuchsergebnisse***

Als Eingangsfeststellung lässt sich sagen, dass sich in der Kokultur zu jedem Zeitpunkt lebende Zellen befinden, wie die PCR-Ergebnisse des Housekeeping-Genes GAPDH zeigen. Dass keine Verunreinigungen während der PCR das Ergebnis verfälschten, bewies die negative Wasserkontrolle in der PCR.

Die durchgeführte PCR brachte folgende Erkenntnisse: Es fand eine Expression aller Hepatozytenmarker (AFP, Albumin, CK – 18 und CK – 19) bei den sortierten GFP- Zellen der Kokultur, also den eingesetzten Hepatozyten, statt. Dabei war das Signal in der Agarosegelelektrophorese für CK-18 schwächer als für CK-19, Albumin und AFP.

Die allein kultivierten Hepatozyten zeigten neben einer durchgehenden GAPDH-Expression ebenfalls eine durchgehende Expression der Hepatozytenmarker. In der qualitativen Elektrophorese zeigte sich dabei eine stärkere Expression von CK-18 und Albumin als für CK-19 und AFP. Das stand in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen der Kokultur, bei der die Hepatozyten ein qualitativ stärkeres Elektrophoresesignal für AFP und CK-19 als für CK-18 zeigten. Ein Erklärungsansatz für dieses Versuchsergebnis ist, dass AFP und CK-

19 Marker eher für ein frühes Stadium der Hepatozyten sind, während CK-18 in Verbindung mit Albumin bei reiferen Hepatozyten überwiegt.

Doch auch die hoch rein sortierten GFP+ Zellen der Kokultur waren in der PCR nach 1, 2 und 3 Wochen Kokultivierung qualitativ positiv für alle Hepatozytenmarker. Dabei war das Signal in der Gelelektrophorese für Albumin und AFP stärker als für CK-18 und CK-19. Ausgangsquelle für die GFP+ Zellen waren MSCs, die, wie die Negativkontrolle zeigte, in einer Monokultur keine Hepatozytenmarker exprimierten. Als morphologische Veränderung konnte das Auftreten binukleärer Zellen aus der gebildeten Schicht der MSCs beobachtet werden.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Einleitende Fragestellung

Gegenstand der Arbeit war die Fragestellung, ob eine Kokultivierung von MSCs mit Hepatozyten eine Differenzierung der MSC in hepatozytäre Zellen ermöglicht. In MSC-Monokulturen war eine solche Differenzierung nicht möglich, unabhängig davon, welche induzierenden Zytokine über verschiedene Zeiträume getestet wurden. Die Fragestellung hierbei war, ob MSCs ein Potential für eine hepatische Differenzierung besitzen und mit welchen Kulturbedingungen dies erzielt werden könnte. Dafür wurden die Zellen auf Platten eingesät und bis zu 3 Wochen kultiviert. Die verwendeten MSCs wurden aus dem Knochenmark von Femur- und Tibiaknochen von Lewis-Ratten gewonnen, anschließend mithilfe eines Retrovirus mit dem Gen für GFP retroviral infiziert [101] und kloniert. Für die Versuche wurde ein ausgewählter Klon verwendet. Das Kulturmedium enthielt neben HGF auch die Wachstumsfaktoren Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor 4 (FGF-4) und den Stem Cell Growth Factor (SCF). Nach einer Kokultivierung von MSC mit frisch isolierten Hepatozyten wurden die Zellen mit Hilfe des FACS in GFP+ und GFP- Zellen getrennt und mittels RT-PCR auf eine leberspezifische Genexpression untersucht. Dabei zeigten die GFP- Zellen in der Kokultur, welche den eingesetzten Hepatozyten entsprachen, in der Gelelektrophorese eine durchgehende Expression der verwendeten Hepatozytenmarker. Im FACS zeigten sich stabile Zellzahlen für die GFP- Zellen aus der Kokultur. Anhand dieser Ergebnisse wurde deutlich, dass die Hepatozyten über den gesamten Zeitraum unter den Kokulturbedingungen überlebten und hierbei ihre Funktion aufrechterhielten. Das bestätigte die Beobachtungen, die mehrere Forschergruppen in Kokulturen mit Hepatozyten machten. So wurde ein Benefit für die Hepatozyten in mehreren Untersuchungen in einer Kokultur mit Zellen aus verschiedenen Geweben gesehen [73-78,102]. Selbst für organ- und artfremde Zellen wie Nierenzellen von einem Affen und humanen Fibroblasten konnte in Kokulturen mit Hepatozyten aus Ratten

---

stammend jeweils im Vergleich zu der Monokultur aus Rattenhepatozyten eine Verlängerung der Überlebenszeit gesehen werden [77,103].

## ***5.2 Phylogenetik der Lebermarker***

Albumin stellt einen Marker für adulte, reife Hepatozyten dar. Albumin kann als Marker vor allem funktionsfähige Hepatozyten anzeigen [72,104-106]. Während Albumin sich erst zunehmend nach der Geburt nachweisen lässt [106], ist das Alpha-Fetoprotein (AFP) ein Marker für fetale Hepatozyten [21,104,106-108]. Die Serumkonzentration von AFP fällt daher nach der Geburt rasch auf kaum nachweisbare Werte ab. Im klinischen Gebrauch kann AFP auch als ein Tumormarker, unter anderem für das Hepatozelluläre Karzinom, verwendet werden [107-111]. Cytokeratin 18 (CK 18) ist ein Marker sowohl für Hepatozyten als auch für Gallengangszellen [40,104,112]. CK 18 ist ein intrazelluläres Protein, es lässt sich bei Lebererkrankungen einhergehend mit Zelluntergängen in der Leber im Patientenserum nachweisen [113]. Auf Gallengangsepithelzellen kann Cytokeratin 19 (CK 19) identifiziert werden [104,112]. Untersucht man Ovalzellen auf diese Proteine, so lässt sich neben CK 18 und CK 19 [16,19,23,112,114] auch AFP nachweisen [19,20,112].

## ***5.3 Genexpression und Charakteristika von MSCs***

Als wesentlichstes Ergebnis der Arbeit fand sich in der Gelelektrophorese eine Genexpression der untersuchten Hepatozytenmarker Albumin, CK 18, CK 19 und AFP bei den GFP<sup>+</sup> MSCs in der Kokultur. In der Monokultur von MSCs fand sich bei identischen Bedingungen, Anwendung einer Fibronectinmatrix sowie Gabe der gleichen Dosis der Wachstumsfaktoren keinerlei nachweisbare Genexpression der erwähnten Hepatozytenmarker. Das bedeutet, dass die verwendeten MSCs bedingt durch die Kokultivierung in der Lage sind, die hepatischen Gene zu exprimieren. Daraus kann man folgern, dass MSCs das

---

Potential besitzen, sich *in vitro* in Hepatozyten zu differenzieren. Das wäre ein weiteres Differenzierungspotential neben dem in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten als Standarddifferenzierung beschriebenen [84,85,115-117]. Auch in Zellen des Nervensystems konnten MSCs differenziert werden. Hinweise hierauf gewannen Azizi et al., die zeigten, dass nach einer intrazerebralen Transplantation von humanen MSCs in Ratten die Stammzellen auch nach einigen Tagen noch nachweisbar waren und im Gehirn lokal wanderten [118]. Chen et al. führten bei Ratten eine zerebrale Ischämie herbei und transplantierten einen Tag später MSCs intrazerebral in das Ischämiegebiet. Im weiteren Verlauf zeigten sich in Verhaltenstesten bessere Ergebnisse im Vergleich mit der Kontrollgruppe. In der histologischen Untersuchung zeigte sich ein Überleben der MSCs sowie eine Expression spezifischer neuraler Proteine [119]. Ebenso wurde die Differenzierung von MSCs in quergestreifte Muskelzellen publiziert [120,121]. Darüber hinaus konnten Toma et al. eine *in vivo* Differenzierung von humanen MSCs in Kardiomyozyten zeigen [122]. Hierfür wurden die gewonnenen MSCs in den linken Ventrikel von Mäusen injiziert. Anschließend konnte nach zwei Monaten eine Differenzierung in kardiiale Muskelzellen nachgewiesen werden. Neben einer Differenzierung in Kardiomyozyten konnten Gojo et al. weiterhin eine Differenzierung in kardiovaskuläre Zellen *in vivo* zeigen [123]. Auch *in vitro* ist es möglich, in MSCs die Expression von typischen kardiomyozytären Proteinen wie z.B. smooth muscle actin (SMA) und Troponin T zu erreichen [115]. Werden humane MSCs mit Epithelzellen aus dem Respirationstrakt zusammen kultiviert, ist es möglich, die MSCs in Epithelzellen zu differenzieren [124]. Jedoch konnten Spees et al. gleichzeitig hierbei auch Zellfusionen zwischen den verschiedenen Zellarten nachweisen. Dies ist für Epithelzellen ein relativ häufig beobachtetes Phänomen [124].

---

#### ***5.4 Interpretation der Versuchsergebnisse vor dem wissenschaftlichen Hintergrund***

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in der Kokultur im Verlauf zunehmend erkennbare binukleäre Zellen. Diese Zellen könnten im Rahmen der hepatischen Differenzierung entstanden sein, da in der Leber viele binukleäre Zellen vorkommen. Bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau war nicht ausgeschlossen, dass hier ebenfalls Zellfusionen stattfanden, da ein direkter Zellkontakt zwischen den Hepatozyten und den Stammzellen ermöglicht wurde. Aus der Versuchsanordnung konnte nicht herausgearbeitet werden, ob die leberspezifische Genexpression, hier durch mRNA-Detektion bewiesen, Folge einer Differenzierung oder von Fusionsvorgängen war. Die Hypothese vermehrter Zellfusionen wurde durch Beobachtungen von Terada et al. unterstützt, die eine in vitro Kultivierung von mononukleären Knochenmarkzellen sowie embryonalen Stammzellen beobachteten. Dabei waren die Knochenmarkzellen wie in der vorliegenden Arbeit zuvor mit einem Gen für GFP infiziert worden. Im Verlauf konnte dann gezeigt werden, dass die embryonalen Stammzellen mit den Knochenmarkzellen fusionierten, da in den embryonalen Zellen GFP nachgewiesen werden konnte. Weiterhin hatten die entstandenen Zellen einen tetraploiden oder sogar hexaploiden Karyotyp, ein weiterer Hinweis für stattgefundene Fusionen [125]. Werden embryonale Stammzellen mit Zellen des zentralen Nervensystems zusammenkultiviert, so können auch hier Fusionen nachgewiesen werden [126]. Terada et al. schlossen aus diesen Beobachtungen, dass über den Weg der Zellfusion die Stammzellen den Charakter der Zellen übernahmen, mit denen eine Fusion stattfand. Dies könnte dann für direkte Differenzierungsvorgänge in den Stammzellen fehlinterpretiert werden [125].

#### ***5.5 Wachstumsfaktor HGF***

Neben dem Ansatz der Kokultivierung ist ein wesentlicher Punkt der Arbeit die Verwendung eines Mediums mit Wachstumsfaktoren. Für eine Reihe von

---

verschiedenen Zellen können Differenzierungen in Hepatozyten unter der Gabe von Wachstumsfaktoren, insbesondere HGF, nachgewiesen werden [66,67,127,128]. Führt man im Tierversuch bei Ratten eine partielle Hepatektomie durch und verabreicht CCl<sub>4</sub>, kommt es zu einer erhöhten DNA-Synthese in den Hepatozyten. Untersucht man das Serum, zeigt sich ein Anstieg des Wachstumsfaktor HGF [129-132]. Hierbei dient HGF als Faktor für die einsetzende Leberregeneration und die Proliferation von Hepatozyten sowie von Ovalzellen. Dies wird durch Untersuchungen bekräftigt, in denen gezeigt werden kann, dass HGF ein vielfältiger Wachstumsfaktor ist, insbesondere für Epithel- und Endothelzellen [133-135] sowie für Hepatozyten [136-140]. Es konnte ein Einfluss von HGF auf das Wachstum von verschiedenen Tumorzellen sowie Metastasen gezeigt werden [141]. Knowles et al. gelang es, über eine Blockierung des HGF-Rezeptors bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich eine Abnahme des Tumorwachstums sowie eine Behinderung des invasiven Wachstums zu erreichen [142]. Der Rezeptor für HGF, auch c-Met genannt, konnte auf verschiedenen Zellarten nachgewiesen werden [143], auch im Knochenmark auf Stromazellen, ohne diese näher zu definieren [144]. Neuss et al. konnten auf humanen MSCs das Vorhandensein des HGF-Rezeptors nachweisen [145]. HGF hat bei MSCs keine proliferative Wirkung. Jedoch konnte eine chemotaktische Wirkung gezeigt werden. So konnten Neuss et al. in einem in vitro Wundversuch die Migration und folgende Zellbesiedlung mit MSCs durch die Verwendung von HGF erreichen. Da auf MSCs Rezeptoren für HGF vorhanden sind, ist es denkbar, dass über diesen Signalweg die leberspezifische Genexpression in Kombination mit der Anwesenheit von Hepatozyten erzielt werden kann, wie es die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen.

## ***5.6 Das therapeutische Potential von MSCs***

Mit dieser Arbeit konnte eine Möglichkeit aufgezeigt werden, eine leberspezifische Genexpression bei MSCs zu induzieren. Dies könnte einen

---

weiteren Ansatz zum Tissue Engineering und Behandlung von Lebererkrankungen mit Hilfe von adulten Stammzellen darstellen. Hierbei sind MSCs eine attraktive Stammzellpopulation, die sich durch eine Reihe von Vorteilen in Hinblick auf Gewinnung und eventuelle klinische Anwendung auszeichnen [96,146]. Im Gegensatz zu anderen Zellarten lassen sich MSCs relativ leicht aus dem Knochenmark isolieren [146], hier ist zum Beispiel die ausgeprägte Plastikadhärenz eine hervorragend verwendbare Eigenschaft für die Kultivierung. Isolierte MSCs sind in vitro leicht in großen Mengen zu expandieren.

Des Weiteren zeichnen sich MSCs bezüglich einer möglichen klinischen Anwendung und Transplantation durch eine beobachtete Immunmodulation aus. Transplantiert man allogene HSCs, besteht die Gefahr einer Graft-versus-host-Disease (GVHD) [147], und die Gabe von Immunsuppressiva ist erforderlich. Für MSCs konnte hingegen beobachtet werden, dass sie keine T-Zellaktivierung auslösen [148] und das lokale Immunsystem supprimieren [149]. In vitro fand sich eine aktive Inhibition der T-Zellproliferation und T-Zellaktivität durch die MSCs [150,151]. Aksu et al. zeigten, dass die Gabe von autologen MSCs bei einer allogenen Knochenmarkinfusion die Toxizität der Knochenmarkinfusion reduzierten und eine auftretende GVHD abschwächten [152]. Itakura et al. transplantierten Knochenmarkzellen in Ratten nach Bestrahlung zur Wiederherstellung der Hämatopoese zusammen mit allogenen MSCs. Dabei kam es in keinem Fall zu einer GVHD, während in der Kontrollgruppe eine Transplantation ohne MSCs in mehreren Fällen zu einer GVHD führte [153].

Unter Berücksichtigung der immunmodulatorischen Potenz von MSCs werden MSCs als Konzept für zukünftige allogene klinische Anwendungen [88] wie die Behandlung von Lebererkrankungen betrachtet. Ein weiteres Forschungsfeld auf der Suche nach möglichen Stammzellen zur Behandlung von Krankheiten ist die Arbeit mit embryonalen Stammzellen. Gegenüber embryonalen Stammzellen haben adulte Zellen und somit auch MSCs den Vorteil, keine ethischen Fragestellungen zu provozieren. Die Verwendung von MSCs ist aus ethischer

---

Sicht unbedenklich. Dies ist ein weiterer Vorteil, der für den Einsatz von MSCs für das Tissue Engineering spricht.

### **5.7 Ausblick**

Mit dieser Arbeit kann der Einfluss von Hepatozyten auf MSCs in vitro gezeigt werden. Hierbei zeigt sich ein Potential von MSCs, leberspezifische Gene zu exprimieren. Dies entspricht einer Differenzierung von MSCs in Hepatozyten. Jedoch kann bei dem Versuchsaufbau nicht zwischen einer direkten Differenzierung der Stammzellen in differenzierte Zellen sowie einer Fusionierung zwischen den verwendeten Hepatozyten und den MSCs unterschieden werden. Beide Mechanismen sind geeignet, die Expression leberspezifischer Gene zu erklären. Für weitergehende Untersuchungen könnte daher die Fragestellung ein explizites Untersuchen auf Fusionsereignisse beinhalten. Sollte sich hierbei zeigen, dass keine Fusionsereignisse, sondern eine direkte Transdifferenzierung der MSCs die Ursache der leberspezifischen Genexpression sind, wäre weiter zu untersuchen, ob der direkte Zellkontakt zwischen den Hepatozyten und Stammzellen hierfür auslösend ist oder ob Signalübertragungen auf molekularer Ebene für diese Differenzierung verantwortlich sind.

## **6 Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss frisch isolierter Hepatozyten auf Mesenchymale Stammzellen in einer Kokultur zu untersuchen. Dabei wurden die MSCs explizit auf die Expression leberspezifischer Gene untersucht. Die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung schwerer Lebererkrankungen und Alternativen zu Organtransplantationen schließt auch die Erforschung von adulten Stammzellen mit ein. MSCs sind verhältnismäßig leicht zu gewinnen und lassen sich mit Methoden der Zellbiologie praktikabel kultivieren. Nachdem für Hämatopoetische Stammzellen die Möglichkeit aufgezeigt wurde, eine Differenzierung in adulte Hepatozyten *in vitro* zu erreichen, waren bei dieser Arbeit MSCs hinsichtlich einer Differenzierung in Hepatozyten untersucht worden.

Hierfür wurden nach 1, 2 und 3 Wochen Kokultivierung GFP-positive MSCs mit Hilfe der Durchflußzytometrie von den Hepatozyten getrennt und auf die Expression von Albumin, CK-18, CK-19 und AFP untersucht. Es zeigte sich, dass die MSCs Albumin, CK-18 und AFP gut nachweisbar und CK-19 schwächer exprimierten. Damit wurde gezeigt, dass die Genexpression der MSCs sich im Verlauf der Kokultur veränderte und spezifische Marker von Leberzellen exprimiert wurden. Mit dieser Arbeit kann daher gezeigt werden, dass MSCs ein Potential für eine leberspezifische Genexpression besitzen und dieses *in vitro* bei einer gemeinsamen Kultivierung mit Hepatozyten nachgewiesen werden kann. Damit sind MSCs eine vielversprechende Zellpopulation für zukünftige regenerative Anwendungen in der Behandlung von Lebererkrankungen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, geeignete Kultursysteme und Mediumzusammensetzungen für eine optimale Generierung von Ersatzsystemen für leberspezifische Regenerationsansätze zu entwickeln.

<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	
AAF	2-Acetylaminofluoren
AFP	AlphaFetoProtein
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlormethan
CD 34	Cluster of Differentiaton
cDNA	complementary DNA
CK-18	Cytokeratin 18
CK-19	Cytokeratin 19
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Groth Factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FGF-4	Fibroblast Growth Factor 4
FGF-7	Fibroblast Growth Factor 7
FISH	Fluoreszenz in Situ Hybridisation
GAPDH	Glyzerin-Aldehyd-Phospho-DeHydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GFP-	Green fluorescent protein Negativ
GFP+	Green fluorescent protein Positiv
GVHD	Graft-versus-Host-Disease
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
KCl	Kaliumchlorid
MAPC	Multipotent adult progenitor cells
mRNA	messenger RNA
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
OC.2	ONECUT 2
OV 6	Oval Cell Marker
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Stem Cell Factor
SMA	smooth muscle actin
ssDNA	single stranded DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolett
V.	Vene

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Skizze des Versuchsablaufes (Aus [97])
Abb. 2	Darstellung der FACS-Ergebnisse der Kokultur nach 1 Woche
Abb. 3	Darstellung der FACS-Ergebnisse der Kokultur nach 2 Wochen
Abb. 4	Darstellung der FACS-Ergebnisse der Kokultur nach 3 Wochen
Abb. 5	Ergebnisse der FACS Sortierung in Tabellenform
Abb. 6	Ergebnisse der FACS Sortierung als Säulendiagramm
Abb. 7	Morphologie und Konfluenz der rMSC nach 1 Woche (a) und nach 3 Wochen (b)
Abb. 8	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für GAPDH der rMSC Monokultur
Abb. 9	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für AFP der rMSC Monokultur
Abb. 10	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für Albumin der rMSC Monokultur
Abb. 11	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für CK 18 der rMSC Monokultur
Abb. 12	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für CK 19 der rMSC Monokultur
Abb. 13	Morphologie der Hepatozyten als Positivkontrolle
Abb. 14	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für GAPDH der Hepatozyten Monokultur
Abb. 15	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für AFP der Hepatozyten Monokultur
Abb. 16	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für Albumin der Hepatozyten Monokultur
Abb. 17	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für CK 18 der Hepatozyten Monokultur
Abb. 18	Gelelektrophorese der PCR – Ergebnisse für CK 19 der Hepatozyten Monokultur
Abb. 19	Morphologie der Kokultur nach 1 Woche und 2 Wochen
Abb. 20	Morphologie der Kokultur nach 3 Wochen
Abb. 21	Gelelektrophorese der PCR - Ergebnisse für GAPDH der Kokultur
Abb. 22	Gelelektrophorese der PCR - Ergebnisse für AFP der Kokultur
Abb. 23	Gelelektrophorese der PCR - Ergebnisse für Albumin der Kokultur
Abb. 24	Gelelektrophorese der PCR - Ergebnisse für CK 18 der Kokultur
Abb. 25	Gelelektrophorese der PCR - Ergebnisse für CK 19 der Kokultur

---

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Michalopoulos, G.K. Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**, 286-300 (2007).
- [2] Higgins, G. & Anderson, R. Experimental pathology of the liver, I: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**, 186-202 (1931).
- [3] Duncan, A.W., Dorrell, C. & Grompe, M. Stem Cells and Liver Regeneration. *Gastroenterology* (2009).
- [4] Van Thiel, D.H., Gavaler, J.S., Kam, I., Francavilla, A., Polimeno, L., Schade, R.R., Smith, J., Diven, W., Penkrot, R.J. & Starzl, T.E. Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology* **93**, 1414-1419 (1987).
- [5] Michalopoulos, G.K. & DeFrances, M.C. Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66 (1997).
- [6] Sakamoto, T., Liu, Z., Murase, N., Ezure, T., Yokomuro, S., Poli, V. & Demetris, A.J. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* **29**, 403-411 (1999).
- [7] Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V. & Taub, R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379-1383 (1996).
- [8] Ohlson, L.C., Koroxenidou, L. & Hallstrom, I.P. Inhibition of in vivo rat liver regeneration by 2-acetylaminofluorene affects the regulation of cell cycle-related proteins. *Hepatology* **27**, 691-696 (1998).
- [9] Farber, E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* **16**, 142-148 (1956).
- [10] Wilson, J.W. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *Journal of Pathology and Bacteriology* **76**, 441 - 449 (1958).
- [11] Lemire, J.M., Shiojiri, N. & Fausto, N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* **139**, 535-552 (1991).

- 
- [12] Thorgeirsson, S.S. Hepatic stem cells. *Am J Pathol* **142**, 1331-1333 (1993).
- [13] Inaoka, Y. Significance of the so-called oval cell proliferation during azo-dye hepatocarcinogenesis. *Gann* **58**, 355-366 (1967).
- [14] Sell, S. & Salman, J. Light- and electron-microscopic autoradiographic analysis of proliferating cells during the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat induced by feeding N-2-fluorenylacetamide in a choline-deficient diet. *Am J Pathol* **114**, 287-300 (1984).
- [15] He, Z.P., Tan, W.Q., Tang, Y.F., Zhang, H.J. & Feng, M.F. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* **37**, 177-187 (2004).
- [16] Pack, R., Heck, R., Dienes, H.P., Oesch, F. & Steinberg, P. Isolation, biochemical characterization, long-term culture, and phenotype modulation of oval cells from carcinogen-fed rats. *Exp Cell Res* **204**, 198-209 (1993).
- [17] Evarts, R.P., Nagy, P., Marsden, E. & Thorgeirsson, S.S. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* **8**, 1737-1740 (1987).
- [18] Haruna, Y., Saito, K., Spaulding, S., Nalesnik, M.A. & Gerber, M.A. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* **23**, 476-481 (1996).
- [19] Hsia, C.C., Evarts, R.P., Nakatsukasa, H., Marsden, E.R. & Thorgeirsson, S.S. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **16**, 1327-1333 (1992).
- [20] Evarts, R.P., Nakatsukasa, H., Marsden, E.R., Hsia, C.C., Dunsford, H.A. & Thorgeirsson, S.S. Cellular and molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res* **50**, 3439-3444 (1990).
- [21] Brill, S., Holst, P., Sigal, S., Zvibel, I., Fiorino, A., Ochs, A., Somasundaran, U. & Reid, L.M. Hepatic progenitor populations in embryonic, neonatal, and adult liver. *Proc Soc Exp Biol Med* **204**, 261-269 (1993).
- [22] Mitaka, T., Sato, F., Mizuguchi, T., Yokono, T. & Mochizuki, Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* **29**, 111-125 (1999).

- 
- [23] Tateno, C. & Yoshizato, K. Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. *Am J Pathol* **149**, 1593-1605 (1996).
- [24] Mitaka, T., Kojima, T., Mizuguchi, T. & Mochizuki, Y. Growth and maturation of small hepatocytes isolated from adult rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 310-317 (1995).
- [25] Potten, C.S. & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020 (1990).
- [26] Hall, P.A. & Watt, F.M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* **106**, 619-633 (1989).
- [27] Verfaillie, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* **12**, 502-508 (2002).
- [28] Slack, J.M. Stem cells in epithelial tissues. *Science* **287**, 1431-1433 (2000).
- [29] Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S. & Goff, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-1170 (1999).
- [30] Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M. & Krause, D.S. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-240 (2000).
- [31] Camargo, F.D., Finegold, M. & Goodell, M.A. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest* **113**, 1266-1270 (2004).
- [32] Willenbring, H., Bailey, A.S., Foster, M., Akkari, Y., Dorrell, C., Olson, S., Finegold, M., Fleming, W.H. & Grompe, M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* **10**, 744-748 (2004).
- [33] Dunsford, H.A., Karnasuta, C., Hunt, J.M. & Sell, S. Different lineages of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res* **49**, 4894-4900 (1989).
- [34] Vessey, C.J. & de la Hall, P.M. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* **33**, 130-141 (2001).
- [35] Engelhardt, N.V., Factor, V.M., Yasova, A.K., Poltoranina, V.S., Baranov, V.N. & Lasareva, M.N. Common antigens of mouse oval and biliary

- epithelial cells. Expression on newly formed hepatocytes. *Differentiation* **45**, 29-37 (1990).
- [36] Engelhardt, N.V., Factor, V.M., Medvinsky, A.L., Baranov, V.N., Lazareva, M.N. & Poltoranina, V.S. Common antigen of oval and biliary epithelial cells (A6) is a differentiation marker of epithelial and erythroid cell lineages in early development of the mouse. *Differentiation* **55**, 19-26 (1993).
- [37] Faris, R.A., Monfils, B.A., Dunsford, H.A. & Hixson, D.C. Antigenic relationship between oval cells and a subpopulation of hepatic foci, nodules, and carcinomas induced by the "resistant hepatocyte" model system. *Cancer Res* **51**, 1308-1317 (1991).
- [38] Petersen, B.E., Goff, J.P., Greenberger, J.S. & Michalopoulos, G.K. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* **27**, 433-445 (1998).
- [39] Fiegel, H.C., Kluth, J., Lioznov, M.V., Holzhueter, S., Fehse, B., Zander, A.R. & Kluth, D. Hepatic lineages isolated from developing rat liver show different ways of maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 46-53 (2003).
- [40] Fiegel, H.C., Park, J.J., Lioznov, M.V., Martin, A., Jaeschke-Melli, S., Kaufmann, P.M., Fehse, B., Zander, A.R. & Kluth, D. Characterization of cell types during rat liver development. *Hepatology* **37**, 148-154 (2003).
- [41] Goldschneider, I., Gordon, L.K. & Morris, R.J. Demonstration of Thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat. *J Exp Med* **148**, 1351-1366 (1978).
- [42] Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L. & Lansdorp, P.M. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* **177**, 1331-1342 (1993).
- [43] Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Miura, Y. & Suda, T. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* **80**, 3044-3050 (1992).
- [44] Lyman, S.D. & Jacobsen, S.E. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* **91**, 1101-1134 (1998).
- [45] Krause, D.S., Ito, T., Fackler, M.J., Smith, O.M., Collector, M.I., Sharkis, S.J. & May, W.S. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* **84**, 691-701 (1994).

- 
- [46] Omori, N., Omori, M., Evarts, R.P., Teramoto, T., Miller, M.J., Hoang, T.N. & Thorgeirsson, S.S. Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* **26**, 720-727 (1997).
- [47] Fujio, K., Evarts, R.P., Hu, Z., Marsden, E.R. & Thorgeirsson, S.S. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest* **70**, 511-516 (1994).
- [48] Johnson, G.R. & Moore, M.A. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* **258**, 726-728 (1975).
- [49] Orelia, C., Peeters, M., Haak, E., van der Horn, K. & Dzierzak, E. Interleukin-1 regulates hematopoietic progenitor and stem cells in the midgestation mouse fetal liver. *Haematologica* **94**, 462-469 (2009).
- [50] Hyun, B.H., Gulati, G.L. & Ashton, J.K. Myeloproliferative disorders. Classification and diagnostic features with special emphasis on chronic myelogenous leukemia and agnogenic myeloid metaplasia. *Clin Lab Med* **10**, 825-838 (1990).
- [51] Deimann, W. & Fahimi, H.D. Induction of focal hemopoiesis in adult rat liver by glucan, a macrophage activator. A cytochemical and ultrastructural study. *Lab Invest* **42**, 217-224 (1980).
- [52] Taniguchi, H., Toyoshima, T., Fukao, K. & Nakauchi, H. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nat Med* **2**, 198-203 (1996).
- [53] Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L. & Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* **6**, 1229-1234 (2000).
- [54] Vassilopoulos, G., Wang, P.R. & Russell, D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-904 (2003).
- [55] Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S. & Grompe, M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901 (2003).
- [56] Wang, X., Ge, S., McNamara, G., Hao, Q.L., Crooks, G.M. & Nolte, J.A. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* **101**, 4201-4208 (2003).

- 
- [57] Newsome, P.N., Johannessen, I., Boyle, S., Dalakas, E., McAulay, K.A., Samuel, K., Rae, F., Forrester, L., Turner, M.L., Hayes, P.C., Harrison, D.J., Bickmore, W.A. & Plevris, J.N. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* **124**, 1891-1900 (2003).
- [58] Ishikawa, F., Drake, C.J., Yang, S., Fleming, P., Minamiguchi, H., Visconti, R.P., Crosby, C.V., Argraves, W.S., Harada, M., Key, L.L., Jr., Livingston, A.G., Wingard, J.R. & Ogawa, M. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* **996**, 174-185 (2003).
- [59] Alison, M.R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A.P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J. & Wright, N.A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* **406**, 257 (2000).
- [60] Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O. & Krause, D.S. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**, 11-16 (2000).
- [61] Korbling, M., Katz, R.L., Khanna, A., Ruifrok, A.C., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R.E. & Estrov, Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* **346**, 738-746 (2002).
- [62] Oh, S.H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N., Higashio, K. & Namba, M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 500-504 (2000).
- [63] Okumoto, K., Saito, T., Hattori, E., Ito, J.I., Adachi, T., Takeda, T., Sugahara, K., Watanabe, H., Saito, K., Togashi, H. & Kawata, S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 691-695 (2003).
- [64] Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S. & Verfaillie, C.M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **109**, 1291-1302 (2002).
- [65] He, Z.P., Tan, W.Q., Tang, Y.F. & Feng, M.F. Differentiation of putative hepatic stem cells derived from adult rats into mature hepatocytes in the presence of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor. *Differentiation* **71**, 281-290 (2003).

- 
- [66] Fiegel, H.C., Lioznov, M.V., Cortes-Dericks, L., Lange, C., Kluth, D., Fehse, B. & Zander, A.R. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **21**, 98-104 (2003).
- [67] Kakinuma, S., Tanaka, Y., Chinzei, R., Watanabe, M., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Teramoto, K., Arii, S., Sato, C., Takase, K., Yasumizu, T. & Teraoka, H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* **21**, 217-227 (2003).
- [68] Block, G.D., Locker, J., Bowen, W.C., Petersen, B.E., Katyal, S., Strom, S.C., Riley, T., Howard, T.A. & Michalopoulos, G.K. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* **132**, 1133-1149 (1996).
- [69] Reid, L.M. Stem cell biology, hormone/matrix synergies and liver differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **2**, 121-130 (1990).
- [70] Berthiaume, F., Moghe, P.V., Toner, M. & Yarmush, M.L. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *Faseb J* **10**, 1471-1484 (1996).
- [71] Mooney, D., Hansen, L., Vacanti, J., Langer, R., Farmer, S. & Ingber, D. Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *J Cell Physiol* **151**, 497-505 (1992).
- [72] Dunn, J.C., Tompkins, R.G. & Yarmush, M.L. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* **7**, 237-245 (1991).
- [73] Utesch, D., Molitor, E., Platt, K.L. & Oesch, F. Differential stabilization of cytochrome P-450 isoenzymes in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**, 858-863 (1991).
- [74] Vandenberghe, Y., Tee, L., Rogiers, V. & Yeoh, G. Transcriptional- and post-transcriptional-dependent regulation of glutathione S-transferase expression in rat hepatocytes as a function of culture conditions. *FEBS Lett* **313**, 155-159 (1992).
- [75] Mesnil, M., Fraslin, J.M., Piccoli, C., Yamasaki, H. & Guguen-Guillouzo, C. Cell contact but not junctional communication (dye coupling) with biliary epithelial cells is required for hepatocytes to maintain differentiated functions. *Exp Cell Res* **173**, 524-533 (1987).

- 
- [76] Goulet, F., Normand, C. & Morin, O. Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology* **8**, 1010-1018 (1988).
- [77] Donato, M.T., Castell, J.V. & Gomez-Lechon, M.J. Co-cultures of hepatocytes with epithelial-like cell lines: expression of drug-biotransformation activities by hepatocytes. *Cell Biol Toxicol* **7**, 1-14 (1991).
- [78] Fraslin, J.M., Kneip, B., Vaulont, S., Glaise, D., Munnich, A. & Guguen-Guillouzo, C. Dependence of hepatocyte-specific gene expression on cell-cell interactions in primary culture. *Embo J* **4**, 2487-2491 (1985).
- [79] Jang, Y.Y., Collector, M.I., Baylin, S.B., Diehl, A.M. & Sharkis, S.J. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* **6**, 532-539 (2004).
- [80] Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II & Petrakova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* **16**, 381-390 (1966).
- [81] Goshima, J., Goldberg, V.M. & Caplan, A.I. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* **12**, 253-258 (1991).
- [82] Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C. & Deliliers, G.L. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* **30**, 783-791 (2002).
- [83] Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L. & Verfaillie, C.M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-2625 (2001).
- [84] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. & Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
- [85] Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B. & Murphy, J.M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* **268**, 189-200 (2001).
- [86] Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M. & Yoo, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* **238**, 265-272 (1998).

- 
- [87] Wakitani, S., Saito, T. & Caplan, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**, 1417-1426 (1995).
- [88] Caplan, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* **213**, 341-347 (2007).
- [89] Tocci, A. & Forte, L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* **4**, 92-96 (2003).
- [90] Lange, C., Schroeder, J., Stute, N., Lioznov, M.V. & Zander, A.R. High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **14**, 70-80 (2005).
- [91] Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.H. & Trajanoski, Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* **8**, 70 (2007).
- [92] Guo, Z., Yang, J., Liu, X., Li, X., Hou, C., Tang, P.H. & Mao, N. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J (Engl)* **114**, 950-953 (2001).
- [93] Bruder, S.P., Ricalton, N.S., Boynton, R.E., Connolly, T.J., Jaiswal, N., Zaia, J. & Barry, F.P. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* **13**, 655-663 (1998).
- [94] Barry, F.P., Boynton, R.E., Haynesworth, S., Murphy, J.M. & Zaia, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 134-139 (1999).
- [95] Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., Haynesworth, S. & Zaia, J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 519-524 (2001).
- [96] Barry, F.P. & Murphy, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 568-584 (2004).
- [97] Lange, C., Bassler, P., Lioznov, M.V., Bruns, H., Kluth, D., Zander, A.R. & Fiegel, H.C. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* **11**, 4497-4504 (2005).

- 
- [98] Kuhlcke, K., Fehse, B., Schilz, A., Loges, S., Lindemann, C., Ayuk, F., Lehmann, F., Stute, N., Fauser, A.A., Zander, A.R. & Eckert, H.G. Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Mol Ther* **5**, 473-478 (2002).
- [99] Seglen, P.O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**, 29-83 (1976).
- [100] Kaufmann, P.M., Kneser, U., Fiegel, H.C., Pollok, J.M., Kluth, D., Izicki, J.R., Herbst, H. & Rogiers, X. Is there an optimal concentration of cotransplanted islets of Langerhans for stimulation of hepatocytes in three dimensional matrices? *Transplantation* **68**, 272-279 (1999).
- [101] Li, Z., Schwieger, M., Lange, C., Kraunus, J., Sun, H., van den Akker, E., Modlich, U., Serinsoz, E., Will, E., von Laer, D., Stocking, C., Fehse, B., Schiedlmeier, B. & Baum, C. Predictable and efficient retroviral gene transfer into murine bone marrow repopulating cells using a defined vector dose. *Exp Hematol* **31**, 1206-1214 (2003).
- [102] Guguen-Guillouzo, C., Clement, B., Baffet, G., Beaumont, C., Morel-Chany, E., Glaise, D. & Guillouzo, A. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* **143**, 47-54 (1983).
- [103] Michalopoulos, G., Russell, F. & Biles, C. Primary cultures of hepatocytes on human fibroblasts. *In Vitro* **15**, 796-806 (1979).
- [104] Shiojiri, N., Lemire, J.M. & Fausto, N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* **51**, 2611-2620 (1991).
- [105] Germain, L., Blouin, M.J. & Marceau, N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* **48**, 4909-4918 (1988).
- [106] Poliard, A.M., Bernuau, D., Tournier, I., Legres, L.G., Schoevaert, D., Feldmann, G. & Sala-Trepat, J.M. Cellular analysis by in situ hybridization and immunoperoxidase of alpha-fetoprotein and albumin gene expression in rat liver during the perinatal period. *J Cell Biol* **103**, 777-786 (1986).
- [107] Abelev, G.I. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res* **14**, 295-358 (1971).
- [108] Sell, S., Becker, F.F., Leffert, H.L. & Watabe, L. Expression of an oncodevelopmental gene product (alpha-fetoprotein) during fetal development and adult oncogenesis. *Cancer Res* **36**, 4239-4249 (1976).

- 
- [109] Okuda, K., Kubo, Y. & Obata, H. Serum alpha-fetoprotein in the relatively early stages of hepatocellular carcinoma and its relationship to gross anatomical types. *Ann N Y Acad Sci* **259**, 248-252 (1975).
- [110] Wu, A.H. & Sell, S. Markers for hepatocellular carcinoma. *Immunol Ser* **53**, 403-422 (1990).
- [111] Leone, N. & Rizzetto, M. [Screening for hepatocellular carcinoma]. *Minerva Med* **96**, 95-108 (2005).
- [112] Thorgeirsson, S.S. Hepatic stem cells in liver regeneration. *Faseb J* **10**, 1249-1256 (1996).
- [113] Vos, M.B., Barve, S., Joshi-Barve, S., Carew, J.D., Whittington, P.F. & McClain, C.J. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **47**, 481-485 (2008).
- [114] Alison, M. Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 710-715 (1998).
- [115] Lange, C., Jaquet, K., Krause, K., Kuck, K. & Zander, A.R. Myogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells [abstract]. *Exp Hematol* **31**, 181 (2003).
- [116] Bruder, S.P., Kurth, A.A., Shea, M., Hayes, W.C., Jaiswal, N. & Kadiyala, S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **16**, 155-162 (1998).
- [117] Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641-650 (1991).
- [118] Azizi, S.A., Stokes, D., Augelli, B.J., DiGirolamo, C. & Prockop, D.J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3908-3913 (1998).
- [119] Chen, J., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Zhang, X. & Chopp, M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* **189**, 49-57 (2001).
- [120] Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-1530 (1998).
- [121] Phinney, D.G., Kopen, G., Isaacson, R.L. & Prockop, D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred

- mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* **72**, 570-585 (1999).
- [122] Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J. & Kessler, P.D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* **105**, 93-98 (2002).
- [123] Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J. & Umezawa, A. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **288**, 51-59 (2003).
- [124] Spees, J.L., Olson, S.D., Ylostalo, J., Lynch, P.J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M.Y. & Prockop, D.J. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2397-2402 (2003).
- [125] Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E. & Scott, E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-545 (2002).
- [126] Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P. & Smith, A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545-548 (2002).
- [127] Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L. & Chen, T.H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669-1675 (2004).
- [128] Hu, A., Cai, J., Zheng, Q., He, X., Pan, Y. & Li, L. Hepatic differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* **116**, 1893-1897 (2003).
- [129] Lindroos, P.M., Zarnegar, R. & Michalopoulos, G.K. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* **13**, 743-750 (1991).
- [130] Nakamura, T., Nawa, K. & Ichihara, A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1450-1459 (1984).
- [131] Michalopoulos, G., Cianciulli, H.D., Novotny, A.R., Kligerman, A.D., Strom, S.C. & Jirtle, R.L. Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture. *Cancer Res* **42**, 4673-4682 (1982).

- 
- [132] Michalopoulos, G., Houck, K.A., Dolan, M.L. & Leutke, N.C. Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* **44**, 4414-4419 (1984).
- [133] Rubin, J.S., Chan, A.M., Bottaro, D.P., Burgess, W.H., Taylor, W.G., Cech, A.C., Hirschfield, D.W., Wong, J., Miki, T., Finch, P.W. & et al. A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 415-419 (1991).
- [134] Kan, M., Zhang, G.H., Zarnegar, R., Michalopoulos, G., Myoken, Y., McKeehan, W.L. & Stevens, J.I. Hepatocyte growth factor/hepatopoyetin A stimulates the growth of rat kidney proximal tubule epithelial cells (RPTE), rat nonparenchymal liver cells, human melanoma cells, mouse keratinocytes and stimulates anchorage-independent growth of SV-40 transformed RPTE. *Biochem Biophys Res Commun* **174**, 331-337 (1991).
- [135] Stephens, P., Hiscox, S., Cook, H., Jiang, W.G., Zhiquiang, W. & Thomas, D.W. Phenotypic variation in the production of bioactive hepatocyte growth factor/scatter factor by oral mucosal and skin fibroblasts. *Wound Repair Regen* **9**, 34-43 (2001).
- [136] Nakamura, T., Teramoto, H. & Ichihara, A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6489-6493 (1986).
- [137] Michalopoulos, G.K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *Faseb J* **4**, 176-187 (1990).
- [138] Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. & Shimizu, S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**, 440-443 (1989).
- [139] Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N. & Nishino, T. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* **224**, 311-316 (1987).
- [140] Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K. & et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *Embo J* **10**, 2867-2878 (1991).
- [141] Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. & Vande Woude, G.F. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 915-925 (2003).

- 
- [142] Knowles, L.M., Stabile, L.P., Egloff, A.M., Rothstein, M.E., Thomas, S.M., Gubish, C.T., Lerner, E.C., Seethala, R.R., Suzuki, S., Quesnelle, K.M., Morgan, S., Ferris, R.L., Grandis, J.R. & Siegfried, J.M. HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 3740-3750 (2009).
- [143] Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F. & Aaronson, S.A. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**, 802-804 (1991).
- [144] Takai, K., Hara, J., Matsumoto, K., Hosoi, G., Osugi, Y., Tawa, A., Okada, S. & Nakamura, T. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood* **89**, 1560-1565 (1997).
- [145] Neuss, S., Becher, E., Woltje, M., Tietze, L. & Jahnen-Dechent, W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* **22**, 405-414 (2004).
- [146] Kode, J.A., Mukherjee, S., Joglekar, M.V. & Hardikar, A.A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* **11**, 377-391 (2009).
- [147] Blazar, B.R., Korngold, R. & Vallera, D.A. Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol Rev* **157**, 79-109 (1997).
- [148] Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M.J., Dennis, J., Haynesworth, S.E. & Koc, O.N. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* **33**, 597-604 (2004).
- [149] Caplan, A.I. & Dennis, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* **98**, 1076-1084 (2006).
- [150] Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C. & Guinan, E.C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75**, 389-397 (2003).
- [151] Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E. & Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* **101**, 3722-3729 (2003).

- [152] Aksu, A.E., Horibe, E., Sacks, J., Ikeguchi, R., Breiting, J., Scozio, M., Unadkat, J. & Feili-Hariri, M. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clin Immunol* **127**, 348-358 (2008).
- [153] Itakura, S., Asari, S., Rawson, J., Ito, T., Todorov, I., Liu, C.P., Sasaki, N., Kandeel, F. & Mullen, Y. Mesenchymal stem cells facilitate the induction of mixed hematopoietic chimerism and islet allograft tolerance without GVHD in the rat. *Am J Transplant* **7**, 336-346 (2007).

## 10 Publikationen

In folgenden Originalarbeiten wurden Teile der vorliegenden Dissertation veröffentlicht:

Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11 (29) : 4497 – 4504

Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic Gene Expression in Cultured Rat Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation Proceedings* 2005; 37 : 276 – 279

## 11 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. A. Zander für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Promotion sowie die Erlaubnis, die Einrichtungen der Klinik zu nutzen.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Claudia Lange für die wertvolle Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und das Korrekturlesen sowie die geduldige Beantwortung aller Fragen.

Ich danke Herrn Arne Düsendau vom Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg für die technische Unterstützung bei der FACS-Analyse.

Bei Herrn Dr. med. H. C. Fiegel und bei Herrn Dr. med. H. Bruns bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Gewinnung der adulten Hepatozyten. Herrn Dr. med. M. Lioznov danke ich für die Einarbeitung in die Laborarbeiten sowie für das kollegiale Arbeitsklima und die konstruktiven Lösungsvorschläge insbesondere bei strukturellen Fragen.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern, Siegrid und Bernd Bassler, sowie meiner Ehefrau Lena für die kontinuierliche Unterstützung während des Studiums. Durch sie wurde das Medizinstudium sowie die Promotion erst möglich.

## **12 Lebenslauf**

Entfällt bei der Online Version aus Datenschutzgründen

## **13 Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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.

Gezeichnet: Philipp Bassler