

Etablierung und Charakterisierung
einer polarisierten Kultur für Signaltransduktionsanalysen
in primären murinen Hepatozyten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl.-Ing Felicia Heidebrecht

geb. am: 11.06.1978 in Cluj-Napoca

Gutachter /in

1. Prof. Dr. S.-E. Behrens
2. Prof. Dr. A. Bader
3. PD Dr. D. Glebe

Halle (Saale), 14. Dezember 2009

Die Forschung hat in Wirklichkeit zwei Gesichter.

Wie ein Räderwerk greifen die Beweisführungen der Tagwissenschaft ineinander, und ihre Resultate haben die Kraft der Gewissheit.

Die Nachtwissenschaft dagegen ist blindes Irren. Sie zögert, stolpert, weicht zurück, gerät ins Schwitzen, schreckt auf. Wie ein Gefangener in seiner Zelle läuft der Geist im Kreis, sucht nach einem Ausweg, springt von Hoffnung zu Enttäuschung, von Begeisterung zu Melancholie. Nichts lässt darauf schließen, dass die Nachtwissenschaft jemals das Tagesstadium erreichen wird, dass der Gefangene dem Dunkel entkommen kann.

*Und geschieht es doch, so ist es unerwartet,
aus dem Nichts, wie eine Urzeugung,
irgendwo,
irgendwann,
wie ein Blitz.*

François Jacob

Abkürzungen

AJ	Adherens Junction	IL-6	Interleukin-6
APS	Ammoniumpersulfat	JAK	Janus Kinase
BSA	Bovines Serum Albumin	MGI	Mouse Genome Informatics
Cyp	Cytochrom P450	ML	Monolayerkultur
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole	MMP	Matrixmetalloproteinase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	PAO	Phenylarsinoxid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	PBS	Phosphate Buffered Saline
DEPC	Diethylpyrocarbonate	PCR	Polymerase Chain Reaction
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	PFA	Paraformaldehyd
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
DPP IV	Dipeptidyl-Peptidase IV	Ser	Serin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	SOCS	Suppressor Of Cytokine Signalling
ECL	Enhanced Chemiluminescence	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SW	Sandwichkultur
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	TBS	Tris Buffered Saline
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transformation	TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethan- 1,2-diamin
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase	Thr	Threonin
EZM	Extrazelluläre Matrix	TIFF	Tagged Image File Format
FCS	Fetal Calf Serum	TJ	Tight Junction
FDA	Fluorescein diacetate	Tyr	Tyrosin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate- Dehydrogenase	üN	über Nacht
		ZO-1	Zonula Occludens-1

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Die Leber.....	6
1.2 Polarität in Epithelgewebe.....	7
1.3 Zelluläre Junctions.....	7
1.3.1 Adherens Junctions.....	8
1.3.2 Tight Junctions.....	8
1.4 Hepatozytenkulturen.....	9
1.4.1 Monolayerkultur.....	9
1.4.2 Sandwichkultur.....	9
1.5 Endozytose	10
1.6 Interleukin-6-Signalweg	11
1.7 Epithelial-mesenchymale Transformation.....	13
1.8 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Zellbiologische Methoden.....	15
2.1.1 Isolierung muriner Hepatozyten.....	15
2.1.2 Vorbereitung des Mini-Bioreaktors	16
2.1.3 Monolayerkultur.....	17
2.1.4 Sandwichkultur.....	18
2.1.5 Stimulation der Kulturen	19
2.1.6 Suspensionskultur.....	19
2.1.7 Fluoresceindiacetat (FDA)-Test.....	19
2.1.8 Annexin V-Test.....	20
2.1.9 Live/Dead-Test.....	20
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.2.1 RNA-Extraktion.....	21
2.2.2 Quantitative Nukleinsäurebestimmung.....	21
2.2.3 Qualitätskontrolle der RNA.....	22
2.2.4 Reverse Transkription.....	22
2.2.5 Primerentwurf.....	22
2.2.6 PCR.....	23
2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.8 Mikroarrays.....	23

2.3 Proteinchemische und immunologische Methoden.....	24
2.3.1 Präparation von Gesamtproteinextrakten und quantitative Proteinbestimmung....	24
2.3.2 Präparation von Zytoplasma- und Kernextrakten.....	24
2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.3.4 Western blot	25
2.3.5 Immundetektion.....	26
2.3.6 Reprobing.....	26
2.3.7 Immunfluoreszenz.....	27
2.4 Bildverarbeitung und Auswertung.....	27
2.4.1 Semiquantitativer Western Blot.....	27
2.4.2 Mikroarrays.....	28
2.4.3 Statistik.....	28
3 Ergebnisse und Diskussion.....	29
3.1 Kultursysteme.....	29
3.1.1 Allgemeines.....	29
3.1.2 Monolayerkultur.....	31
3.1.3 Sandwichkultur.....	37
3.2 Etablierte Protokolle.....	41
3.2.1 Neuetablierung eines Protokolls zur Durchführung eines semiquantitativen Western-Blot.....	41
3.2.2 Neu etablierte experimentelle Protokolle in Sandwichkultur.....	47
3.3 Untersuchungen zur Polarität in Monolayer- und Sandwichkulturen.....	57
3.3.1 Monolayerkultur.....	57
3.3.2 Sandwichkultur.....	59
3.4 Reaktion auf Interleukin-6 in Monolayer- und Sandwichkultur.....	61
3.5 Endozytose in Hepatozytenkulturen.....	69
3.6 Transformation in Hepatozytenkulturen.....	78
3.7 Isolierung.....	84
3.8 Abschließender Vergleich.....	86
4 Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis	92
Anhänge	102

1 Einleitung

Polarität (d.h. die spezifische Ausrichtung der Zellstruktur) ist eine wichtige Eigenschaft von Leberzellen *in vivo* und stellt eine Voraussetzung für viele leberspezifische Vorgänge dar. Verschiedene Zelllinien wie MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) [1] oder WIF-B (Hepatozelluläre Karzinom-Hybridzelllinie) [2] wurden als Modelle für Polarität, Transport und Proteinsortierung etabliert. Da die charakteristischen Funktionen von Leberzellen (Stoffwechsel, Produktion bestimmter Proteine usw.) in Zelllinien aber nur begrenzt erhalten sind [3], ist es für einige Fragestellungen (wie z.B. Regulation der Endozytose bei leberspezifischen Prozessen) notwendig, mit primären Zellen zu arbeiten. Eine polarisierte Kultur für primäre Rattenhepatozyten (Sandwichkultur) wurde schon 1989 von Dunn et al. [4] beschrieben, allerdings bietet die Maus als Modellorganismus mehr Möglichkeiten für genetische Analysen. Bis jetzt gibt es jedoch kein *in-vitro*-System für polarisierte primäre murine Hepatozyten.

In dieser Arbeit wurde ein solches System etabliert. Da dieses System im Rahmen des BMBF-Projekts Endosys („Systems Biology of Hepatocyte Endocytosis“) von Kooperationspartnern verwendet werden sollte, um Endozytose in primären Hepatozyten zu untersuchen, wurden zunächst dafür benötigte Analysemethoden etabliert. Anschließend wurde das Kultursystem anhand einer Betrachtung des Interleukin-6-Signalwegs auf seine Eignung für die in Endosys geplanten Aufgaben hin untersucht.

1.1 Die Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen. Zu ihren Funktionen zählen der Kohlenhydrat-, Aminosäure-, Protein- und Lipidstoffwechsel, sowie die Biotransformation von Xenobiotika (Entgiftung), die Abwehrfunktion, Speicherfunktion, Synthese von Hormonen, Regulation des Säure-Base-Haushalts, Gallenbildung und -sekretion [5].

Hepatozyten, die Parenchymzellen der Leber, stellen die Mehrheit der Leberzellen dar (60-65%). Außerdem befinden sich in der Leber in geringer Anzahl Endothelzellen (15-20%), Kupffer-Zellen (Makrophagen) (8-12%) und Ito-Zellen (3-8%) (Fettspeicherzellen) [6].

Der Stoffaustausch zwischen Leberzellen und Organismus erfolgt über Blutgefäße und Gallengänge, jeder Hepatozyt hat Zugang zu Blutkapillaren und Gallenkanälchen. Das arterielle Blut versorgt die Leber mit Sauerstoff, das venöse bringt Nährstoffe aus Magen, Darm, Pankreas und Milz zur Metabolisierung. Die Gallenflüssigkeit wird von den Hepatozyten produziert und enthält Bilirubin, Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipide, die für die Verdauung von Fetten im Dünndarm erforderlich sind. Gleichzeitig transportiert

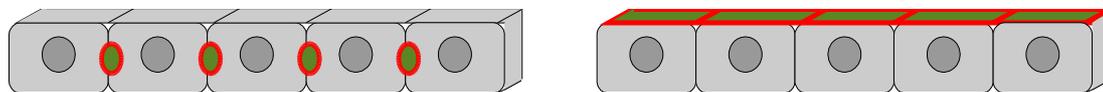
die Galle die in der Leber metabolisierten Gifte und Stoffwechselprodukte in den Darm, wo sie anschließend ausgeschieden werden können [5], [7].

1.2 Polarität in Epithelgewebe

Die Parenchymzellen (Hepatozyten) befinden sich als Epithel in einer Umgebung aus Bindegewebe und Blutgefäßen [7].

Allgemein wird das Epithel als ein Gewebe definiert, das aus einer oder mehreren Zellschichten besteht, die die inneren und äußeren Körperoberflächen auskleiden [8]. Zu den Funktionen eines Epithelgewebes gehören die Barrierefunktion (physikalische Trennung verschiedener Räume und/oder chemische Trennung – kein Flüssigkeitsverlust durch die Zellschicht) und die Transportfunktion (z.B. Resorption bei der Nahrungsaufnahme in der Darmschleimhaut oder Sekretion von Hormonen aus endokrinen Drüsen) [7].

Eine wichtige Eigenschaft von Epithelzellen ist die Polarität. Eine Zelle wird als polarisiert bezeichnet, wenn ihre Membran oder ihr Zytoplasma verschiedene strukturelle und/oder funktionelle Bereiche enthält. Diese Bereiche sind durch ihre spezifische Zusammensetzung von Lipiden und Proteinen charakterisiert und ermöglichen, dass spezifische Prozesse räumlich getrennt stattfinden können.



Polarität in Hepatozyten

Polarität in einfachen Epithelzellen

Abbildung 1.1: Polarität in Hepatozyten und einfachen Epithelzellen. Illustration nach Peng et al. [9]. Grün: Apikaler Bereich; Rot: Grenze zwischen apikalem und basolateralem Bereich; Dunkelgrau: Zellkern

Epitheliale Zellen haben eine apikale und eine basolaterale Membran, getrennt durch *Tight Junctions*. Hepatozyten sind spezielle polarisierte Zellen. Ihre apikale Seite bildet die Gallenkanälchen, die basale grenzt an die Blutgefäße, und durch die laterale Membran bilden die Zellen Kontakte zu angrenzenden Hepatozyten. Ein Hepatozyt hat mehrere apikale Bereiche [4], [10], [9] und durch die Verbindung apikaler Regionen benachbarter Zellen entstehen die Gallenkanälchen. Ein Vergleich der Polarität von Hepatozyten und einfachen epithelialen Zellen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

1.3 Zelluläre Junctions

Um eine undurchlässige Schicht zu bilden, müssen die Zellen fest aneinander und an eine

extrazelluläre Matrix (EZM) binden. Diese Adhäsion erfolgt über Strukturen, die als *Junctions* bekannt sind. Einige *Junctions* dienen zusätzlich der Trennung verschiedener Membranbereiche (z.B. apikal von basolateral). Epithelzellen haben drei Arten *Junctions* für Adhäsion (*Adherens junctions*, *Tight Junctions* und Desmosomen) und die *Gap Junctions* für den Stofftransport zwischen den Zellen. Zusätzlich gibt es *Junctions*, die Zellen mit der EZM verbinden [11], [12]. Im Allgemeinen besteht eine *Junction* aus Transmembranproteinen, die zur Verbindung mit anderen Zellen oder mit der EZM dienen, und intrazellulären Proteinen, die in der Regel an das Zytoskelett binden. Viele *Junctions* haben nicht nur eine strukturelle Funktion, sondern können auch zusätzlich an der Signalweiterleitung beteiligt sein [11].

In dieser Arbeit wurde die Polarität der kultivierten Zellen anhand der *Adherens* und *Tight Junctions* untersucht.

1.3.1 *Adherens Junctions*

Die typische *Adherens Junction* (AJ) besteht aus einem Cadherin-Catenin-Komplex. Cadherine sind Transmembranproteine, die extrazellulär eine Ca^{2+} -abhängige Bindung mit Cadherinen benachbarter Zellen eingehen und intrazellulär durch β -, γ - und α -Catenin an das Actin-Zytoskelett binden [11], [12], [13]. Auf diese Weise erhält der Zellverband mechanische Stabilität.

Ein Merkmal polarisierter Epithelzellen ist die Präsenz von E-Cadherin in AJ. Eine schwache oder fehlende Expression von E-Cadherin ist ein Zeichen für eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ein Prozess, der häufig einerseits während der Embryogenese und andererseits während der Krebsentwicklung beobachtet wird. Dabei verlieren benachbarte Zellen den Kontakt zueinander und entwickeln migratorische Eigenschaften [14], [15]. Auch *in vitro* können primäre Epithelzellen durch EMT-ähnlichen Prozesse dedifferenzieren, wenn die Kulturbedingungen nicht geeignet sind.

1.3.2 *Tight Junctions*

Die TJ erfüllen eine Barrierefunktion (Abdichten der Zellzwischenräume) und eine *Fence*-Funktion (Verhinderung der Diffusion von Proteinen und Lipiden innerhalb der Membrandoppelschicht zwischen den Membranregionen, z.B. zwischen apikalen und basolateralen Regionen) [3].

Die wichtigsten Transmembranproteine der *Tight Junctions* (TJ) sind die Claudine und Occludin, die eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Funktion dieser Junctions spielen [12]. Der Kontakt mit dem Zytoskelett erfolgt mithilfe verschiedener Proteine, darunter die Zonula-occludens-Proteine (ZO-1, -2 und -3), die häufig als TJ-Marker verwendet werden

[13], [16]. In dieser Arbeit wurde die apikale Lokalisierung von ZO-1 als Merkmal einer ausgebildeten Polarität verwendet.

1.4 Hepatozytenkulturen

Die am häufigsten verwendeten Hepatozytenkulturen sind die Monolayer- und die Sandwichkultur.

1.4.1 Monolayerkultur

Die erste Monolayerkultur für primäre Hepatozyten wurde für Rattenzellen etabliert und die Methode ist in [17] und [18] zusammengefasst. In dieser Kultur werden die Zellen auf einer dünnen Schicht aus einem EZM-Protein (meistens Collagen I) kultiviert (siehe Abbildung 1.2 A).

Verschiedene Parameter (Beschichtung, Zelldichte, Kulturmedium, Mediumzusätze) können die Kultureigenschaften beeinflussen [19]. Zum Beispiel führt die Beschichtung der Kulturplatten mit Laminin statt Collagen I zu einer verlängerten Albuminsekretion [20], eine serumfreie Kultur sorgt für die Aufrechterhaltung der Expression einiger leberspezifischer Gene [21], während die Zugabe von Serum eine Hemmung des Wachstums bewirkt [22].

In einer Monolayerkultur weisen die Hepatozyten zuerst eine rechteckige Form auf, und bilden *Tight junctions* und Desmosomen [23]. Nach kurzer Zeit (3-5 Tage) findet aber eine Dedifferenzierung statt, wobei die spezifischen hepatischen Funktionen abnehmen, die Zellen verändern ihre Form, und eine erhöhte Expression von Actin, Tubulin und Collagen I ist zu beobachten [17]. Trotz dieser Nachteile ist die Monolayerkultur einfach zu handhaben und eignet sich für viele Analysen wie Gen- oder Proteinexpression, Immunfärbung. Eine für primäre Maushepatozyten optimierte Monolayerkultur für Signaltransduktionsanalysen wurde 2006 beschrieben [24] und wurde in dieser Arbeit der neu etablierten Kultur gegenübergestellt.

1.4.2 Sandwichkultur

Die Sandwichkultur wurde zunächst für Rattenhepatozyten von Dunn et al. [4] als eine Langzeitkultur beschrieben (siehe schematische Darstellung in Abbildung 1.2). In dieser Kultur werden die Zellen zwischen zwei Schichten Collagen kultiviert, die dicker sind als in der Monolayerkultur. Direkte Vergleiche mit der Monolayerkultur haben gezeigt, dass in der Sandwichkultur die *in-vivo*-ähnliche Zellmorphologie und die Expression leberspezifischer Gene länger erhalten bleibt [4], [25], [26] und auch die Polarität entspricht der in Leberschnitten [27].

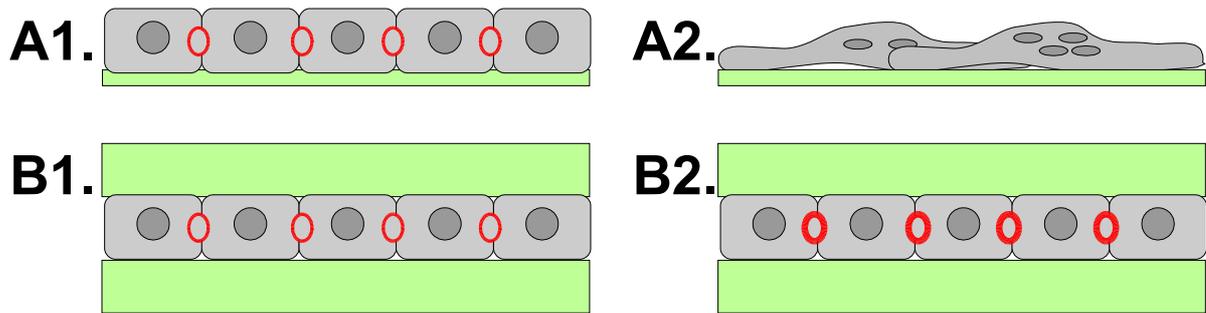


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Monolayer- (A.) und Sandwichkultur (B.) am ersten Tag nach der Kultivierung (A1. bzw. B1.) und einige Tage später (A2. bzw. B2.). Die Sandwichkultur ist stabiler und verhindert die in Monolayer beobachtete frühe Dedifferenzierung der Zellen. Rot: TJ; Dunkelgrau: Zellkerne; Grün: Collagenschicht

Im Gegensatz zur Monolayerkultur weisen die Hepatozyten in Sandwichkultur viele lebercharakteristische Stoffwechselreaktionen auf [28]. Aus diesem Grund wird diese Kultur als *in vitro*-System zum Testen verschiedener Pharmazeutika verwendet [29], [30]. Da sie bislang jedoch noch nicht für murine Hepatozyten beschrieben wurde, wurde sie für diese Arbeit entsprechend angepasst.

Auch für die Sandwichkultur wurde der Einfluss verschiedener Parameter wie Zelldichte, Kulturmedium, Beschichtung und Sauerstoffversorgung auf die Morphologie und Funktion der Zellen untersucht [31], [32], [33]. So führt z.B. eine höhere Zelldichte zu einer verstärkten Bildung von Gallenkanälchen [31], [34], und die Kultivierung der Hepatozyten in Sandwich auf einer sauerstoffdurchlässigen Membran verbessert die Stoffwechseleigenschaften der Kultur [33]. Die dahingehend modifizierte von Schmitmeier et al. [35] beschriebene Kulturplatte wurde für die Etablierung einer Sandwichkultur für murine Hepatozyten in dieser Arbeit verwendet. In dem neu etablierten Kultursystem wurden Aspekte des Interleukin-6-Signalwegs untersucht.

1.5 Endozytose

Proteine aus dem extrazellulären Raum, die durch die hydrophobe Doppelschicht der Plasmamembran nicht diffundieren können, werden in allen Zellen mittels Endozytose aufgenommen. Dabei bildet die Membran Einstülpungen, die die Proteine umschließen und sich von der Membran ins Zytoplasma lösen (Vesikel). Diese dienen zum Transport in der Zelle und fusionieren mit frühen Endosomen (von einer Membran umgebene Organellen), in denen die endozytierten Proteine sortiert werden. Anschließend können die Proteine verschiedenen Wegen folgen: Sie können zurück an die Membran transportiert, durch Transzytose in eine andere Membranregion befördert oder in den Lysosomen degradiert

werden [12]. Molekulare Aspekte der Endozytose sind von Miaczynska und Zerial [36] beschrieben. Die Endozytose ist nicht nur für die Aufnahme verschiedener Moleküle wichtig, immer mehr Studien beschäftigen sich mit ihrer Rolle bei der Signaltransduktion [37].

1.6 Interleukin-6-Signalweg

Interleukin-6 (IL-6) gehört zusammen mit Interleukin-1 (IL-1), LIF (Leukemia inhibitory factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), CT-1 (cardiotrophin 1) und CLC (cardiotrophin-like cytokine) zu einer Proteinfamilie, deren Rezeptoren aus zwei gp130-Einheiten und einer spezifischen Einheit bestehen. Sie besitzen keine eigene Kinaseaktivität, jedoch ist mit jeder gp130-Einheit eine Kinase von der Familie der Janus-Kinasen (JAK) im nicht aktivem Zustand assoziiert. Nach der Ligandenbindung findet eine Multimerisierung des Rezeptors statt, und anschließend phosphorylieren die zwei JAKs sich gegenseitig und den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors. An dem phosphorylierten Rezeptor können STATs (Signal Transducer und Activator of Transcription) binden, und nach deren Phosphorylierung bilden sie Homo- oder Heterodimere, die im Zellkern die Transkription bestimmter Gene beeinflussen [38], [39] (siehe Abbildung 1.3).

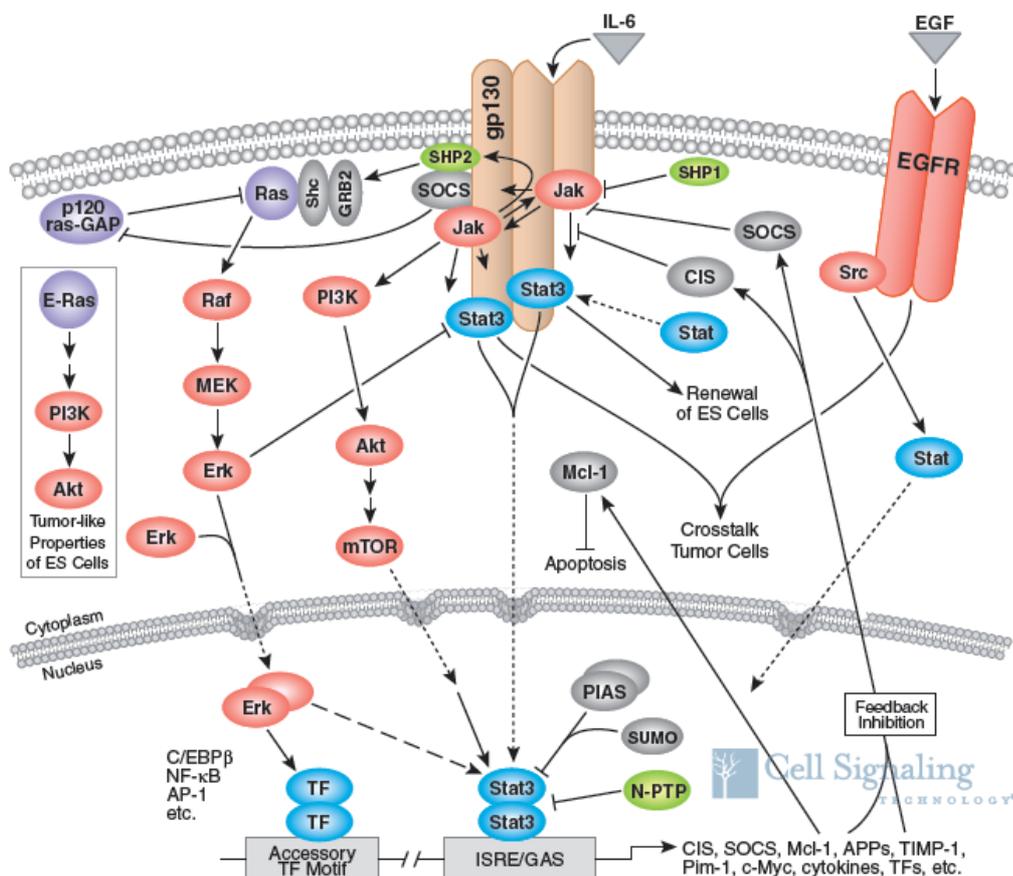


Abbildung 1.3: Darstellung des IL-6-Signalwegs von <http://www.cellsignal.com/pathways/jak-stat.jsp>

Es gibt vier verschiedene JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) und sieben STATs (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6), davon können durch IL-6 JAK1, JAK2, TYK2, STAT3 und STAT1 aktiviert werden [38].

Außer dem JAK/STAT-Signalweg werden von IL-6 auch die MAPK- (Mitogen-activated protein kinase) und PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT-Signalwege aktiviert [39] (siehe Abbildung 1.3).

IL-6 wird in der Leber in Kupffer-Zellen produziert, und bindet an IL-6-Rezeptoren von Hepatozyten.

Die Wirkung des Signalwegs ist in der Regel transient (mit Ausnahme von einigen Tumorzellen [40], [41]) und kann von drei Klassen negativer Regulatoren ausgeschaltet werden [39], [42], [43]:

- Über Proteine der SOCS-Familie (Suppressors of cytokine signaling: CIS und SOCS1-6) läuft eine negative Feedback-Regulierung ab. Die Transkription des SOCS-Gens wird von den phosphorylierten STATs aktiviert. SOCS bindet an die aktivierten JAKs (und inhibiert dadurch ihre Kinaseaktivität) und an Zytokinrezeptoren (wo es die Bindungsstellen für JAKs oder STATs blockiert).
- PIAS (protein inhibitors of activated stats) verhindern eine Bindung aktivierter STAT-Dimere an DNA.
- PTPs (protein tyrosine phosphatases) (z. B. SHP-1, SHP-2) dephosphorylieren STATs, JAKs und die Rezeptoren.

Ein Aspekt des IL-6-Signalwegs, der bislang wenig untersucht wurde, ist die Rolle der Endozytose bei der Signalweiterleitung. Einige Studien an Zelllinien haben gezeigt, dass die rezeptorvermittelte Endozytose für den zytoplasmatischen Transport von STAT3 notwendig ist [44], und dass STAT3 mit frühen Endosomen colokalisiert [45].

Außerdem wurde gezeigt, dass in Hep3B-Zellen die Behandlung mit Endozytose-Inhibitoren auch den IL6-stimulierten STAT3-Signalweg hemmt [45]. Desweiteren wird nach Unterdrückung der Endozytose die Aktivität von STAT3 als Transkriptionsfaktor inhibiert [44].

Da STAT3 die Hauptrolle im IL-6-Signalweg spielt [39], sind viele direkt von STAT-3 aktivierte Gene schon bekannt [46] (siehe Tabelle 1.1).

IL-6 beeinflusst verschiedene Prozesse: das "priming" (Übergang von der G₀- zur G₁-Phase des Zellzyklus) von Hepatozyten in der regenerierenden Leber, das Zellwachstum, die Akut-Phase-Reaktion, die Apoptose, die Proliferation und die Glukoneogenese [47] - [55]. Die Wirkung des Signalwegs ist systemabhängig, und es können je nach Zelltyp verschiedene Funktionen aktiviert werden [38], [55], [56].

Tabelle 1.1: STAT3-aktivierte Gene (modifiziert nach[46])

Prozess	Gen
Proliferation	C-myc, Cyclin D1, D2, D3, A, Cdc25a, p21
Apoptose	Survivin, Fas, mcl-1, Bcl-XL, Bcl-2
Angiogenese	VEGF
Invasion/Metastase	MMP-2
Transformation	MMP-9

Über den IL-6-Signalweg bei primären Hepatozyten in Kultur ist wenig bekannt. Einige Publikationen zeigen die Phosphorylierung von STAT3 [24] oder die Inhibierung der Proliferation [57] nach Stimulation mit IL-6 in Monolayer-Kulturen, aber die Expression von STAT3-aktivierten Genen wurde bis jetzt nur in Zelllinien [46] oder in frisch isolierten Hepatozyten in Suspension [58] untersucht. Zur Signaltransduktion in Sandwichkultur liegen bislang keine Studien vor. Da diese Kultur aber die Morphologie und Funktion von primären Hepatozyten am besten wiedergibt, ist es denkbar, dass auch die Antworten der Zellen auf Stimuli in Sandwichkultur dem Verhalten der Zellen *in vivo* am nächsten kommen.

Während der Arbeit stellte es sich als sinnvoll heraus, zusätzliche Untersuchungen durchzuführen, um die in den Kulturen beobachteten Transformationen genauer zu charakterisieren.

1.7 Epithelial-mesenchymale Transformation

Die Epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) und die mesenchymal-epitheliale Transformation (MET) sind häufig beobachtete Phänomene während der embryonalen Entwicklung bei Prozessen wie Gastrulation oder Migration der Neuralleistenzellen, aber auch in pathologischen Situationen wie z.B. Tumorentwicklung oder Fibrose [59], [15], [60]. Die EMT ist ein sehr komplexer Vorgang, der sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden kann, daher ist es nicht einfach, eine präzise Definition zu finden. Die EMT kann als morphologische Umwandlung von Epithelschichten in einzelne, fibroblasten-ähnliche Zellen definiert werden [61]. Nach Janda et al. ([62]) erlangen die Zellen durch die EMT epitheliale Plastizität, die zu dauerhaften morphologischen und dramatischen molekularen Änderungen führt. Eine weniger drastische Veränderung von epithelialen zu fibroblastoiden Zellen wird als „Scattering“ bezeichnet ([63]). Charakteristisch für eine EMT sind: Aufbrechen der AJ, verringerte Transkription von e-cadherin, Zytoskeletumbau, Hochregulation mesenchymaler Marker wie Vimentin [61], Kernlokalisierung von β -Catenin [64] und in manchen Fällen Hochregulierung von Fibronectin sowie Collagen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [60]. Die Auflösung der AJ kann auch durch posttranskriptionale Modifikationen einiger Proteine (z.B. von E-Cadherin) stattfinden, deren Internalisierung und Abbau dadurch

eingeleitet wird [61], [65]. Merkmale von *Scattering* sind der Verlust der intrazellulären Junctions (Zell-Zell-Kontakte), Gewinn der Migrationsfähigkeit durch Zytoskeletumbau und Bildung von neuen Zell-Matrix-Adhäsionen, Reversibilität des Zellphänotyps, keine dauerhaften Änderungen der Genexpression wie z.B. die Herunterregulation epithelialer Gene bei der EMT. *Scattering* ist in der Regel nicht mit Tumorigenität verbunden [66] [60].

1.8 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte ein Kultursystem für polarisierte primäre Maushepatozyten etabliert werden, mit dem sich molekulargenetische und proteinbiochemische Untersuchungen durchführen lassen. Dieses Kultursystem und eine konventionelle Monolayerkultur sollten vergleichend charakterisiert werden. Anschließend sollte seine Eignung für Studien von Endozytose und Signaltransduktion (am Beispiel des IL-6-Signalwegs) untersucht werden. Dazu wurden folgende Schritte geplant:

- Etablierung einer Zellkultur für Maushepatozyten auf Basis der für Ratte beschriebenen Sandwich-Kultur
- Etablierung von Protokollen für molekularbiologische, proteinchemische und immunologische Experimente in der Sandwichkultur
- Nachweis der Polarität der Hepatozyten in der Sandwichkultur im Vergleich zur konventionellen Kultur (Monolayer)
- Erweiterung des semiquantitativen Western-Blot-Verfahrens zum besseren Vergleich der Proteinexpression in den beiden Kultursystemen.
- Ermittlung des Einflusses des Kulturtyps (Monolayer/Sandwich) auf den IL-6-Signalweg
- Betrachtung einiger Aspekte der Rolle von Endozytose im IL-6-Signalweg

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien sind in Anhang A, die Geräte in Anhang B und die Puffer, Medien sowie Lösungen (in diesem Kapitel *kursiv* geschrieben) in Anhang C aufgelistet. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Isolierung muriner Hepatozyten¹

Die für diese Arbeit verwendeten Zellen wurden nach zwei Protokollen isoliert:

Material: Collagenase IA, Williams Medium E

Protokoll 1

Hanks-Puffer I und *II* wurden einen Tag vor der Isolation vorbereitet und sterilfiltriert.

Durchführung:

Die hier beschriebene Verfahrensweise zur Isolation muriner Hepatozyten ist abgeleitet von der von Klingmüller et al. beschriebenen Methode [24]. Für die Hepatozytenkultur wurden männliche 6-12 Wochen alte NMRI-Mäuse benutzt. Die *in-situ*-Perfusion der Leber wurde in einer Isolationsapparatur durchgeführt, die aus einem Pufferkreislauf und einem entgegengesetzt gerichteten Wärmekreislauf (42°C) besteht. Dadurch wurde eine konstante Puffertemperatur von 37°C gewährleistet. Ein zwischengeschalteter Blasenfänger diente außerdem der Druckkontrolle im Perfusionssystem. Die Narkotisierung der Maus erfolgte intraperitoneal mit 300 µl Pentobarbital (12mg/ml). Nach Öffnen des Bauchraums und Freilegen der Leber wurde diese *in situ* über die *Vena cava posterior* für 10 Minuten mit *Hanks-Puffer I* gespült und dadurch entblutet, während die durchtrennte *Vena portae* als Abfluss diente. Es schloss sich die Perfusion mit *Hanks-Puffer II* an (5-10 Minuten). Die Fließgeschwindigkeit während der gesamten Perfusion betrug 8-10 ml/min. Nach dem Verdau wurde die Leber herauspräpariert und die Gallenblase entfernt. Durch vorsichtiges Schwenken der Leber in einer Petrischale wurden die Einzelzellen gewonnen und in *Isolationsmedium* (RT) aufgenommen und schließlich über sterile Gaze (100µm) filtriert, um Zellaggregate zu entfernen. Nach der Zentrifugation (5 min, 50 x g, RT) wurden die Zellen nochmals mit Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet

¹ Die Isolierung wurde von Isabell Schulz durchgeführt

vorsichtig gelockert und in einem definierten Mediumvolumen resuspendiert. Durch die Zentrifugation wurde sichergestellt, dass eine annähernd homogene Hepatozytenpopulation für die Kultur benutzt wurde. Die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte mittels Trypan-Blau-Färbung in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop. Die durchschnittliche Vitalität der Hepatozyten lag bei 70-80%.

Protokoll 2

Die *Lösungen A, B* und *C* wurden einen Tag vor der Isolation angesetzt und sterilfiltriert.

Durchführung:

Die Isolation erfolgte wie im Protokoll 1 beschrieben, mit folgenden Änderungen: Statt *Hanks-Puffer I, II* und *Isolationsmedium* wurden die *Lösungen A, B* und *C* verwendet und die gesamte Aufarbeitung der Zellen fand bei 4°C statt.

2.1.2 Vorbereitung des Mini-Bioreaktors

Material: Teflonmembran, Minibioreaktoren

Durchführung:

Sowohl für die Monolayerkultur als auch für die Sandwichkultur wurde der in Abbildung 2.1 dargestellte Mini-Bioreaktor verwendet, der in [35] beschrieben ist.

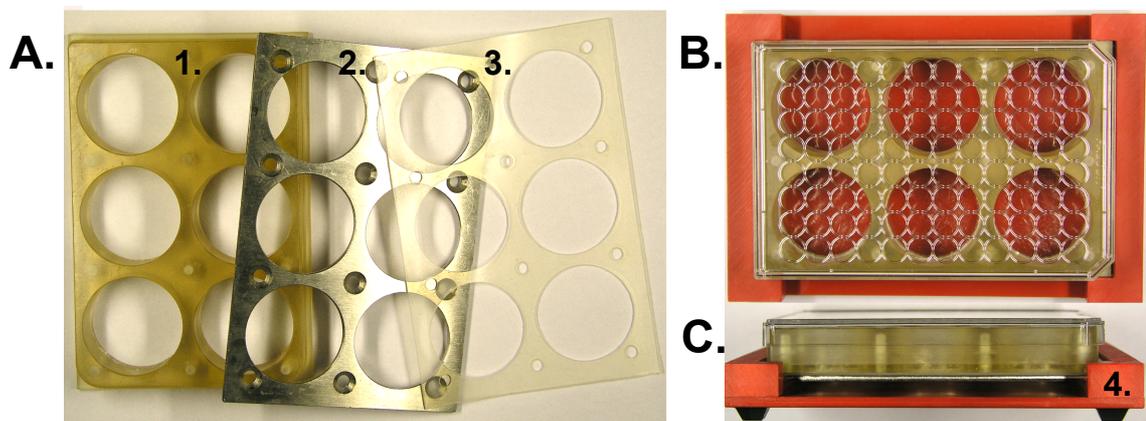


Abbildung 2.1: Einzelteile (A), zusammgebauter Mini-Bioreaktor (B, C); Hauptteil (1), Metallboden (2), Dichtung (3), Halterung (4)

Zwischen dem Hauptteil und der Dichtung wird eine gaspermeable Teflonmembran gespannt und mithilfe eines Metallbodens festgeschraubt. Der zusammgebauete Bioreaktor wird autoklaviert und für die Zellkultur mit einem Deckel verschlossen. Eine Halterung sorgt dafür, dass die untere Seite des Bioreaktors direkten Kontakt zur Umgebungsatmosphäre im Inkubator hat. Eine schematische Darstellung einer Kultur in Bioreaktor ist in Abbildung 2.2 zu sehen. In dieser Arbeit wurden 6-Well-Mini-Bioreaktoren verwendet.

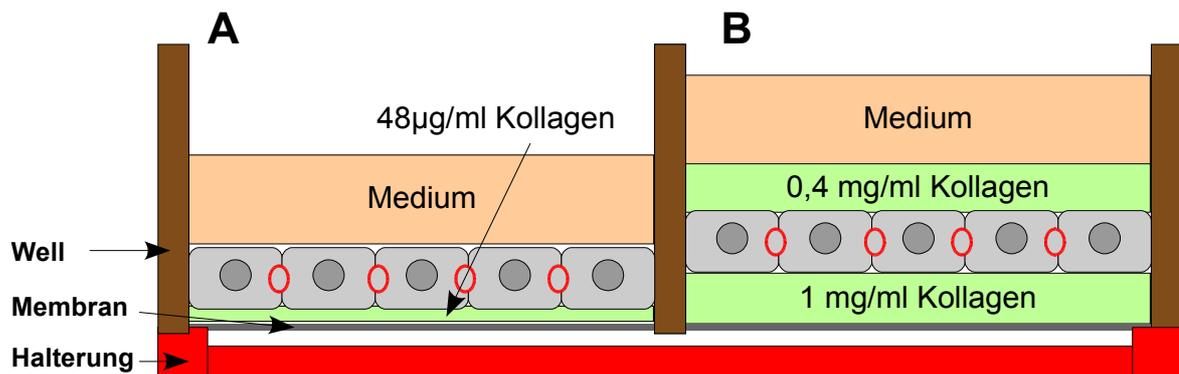


Abbildung 2.2: Zellkultur in Mini-Bioreaktor: Monolayer (A), Sandwich (B)

2.1.3 Monolayerkultur

Material: Collagen I, PBS, Medium 1, 2, 3, Collagen-Lösung für Monolayerbeschichtung

Durchführung:

- Beschichtung des Mini-Bioreaktors:

Je 1 ml *Collagen-Lösung für Monolayerbeschichtung* wurde in jedes Well eines 6-Well-Bioreaktors gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Wells zweimal mit sterilem doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Kollagenbeschichtete Bioreaktoren können für mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

- Aussaat und Kultur der Zellen:

Der Tag der Isolation wurde als Tag 0 definiert. Frisch isolierte Hepatozyten wurden in Medium 1 aufgenommen und mit einer Konzentration von 75000 Zellen/cm² (für polarisierte Kulturen) oder 10000 Zellen/cm² (für nichtpolarisierte Kulturen) ausgesät. 2 ml Zellsuspension wurden pro Well pipettiert. Die Kultur wurde für eine Stunde in den Inkubator gestellt (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit), um die Adhärenz der Hepatozyten zu gewährleisten, und nach einer Stunde mit warmem PBS (1×) gewaschen.

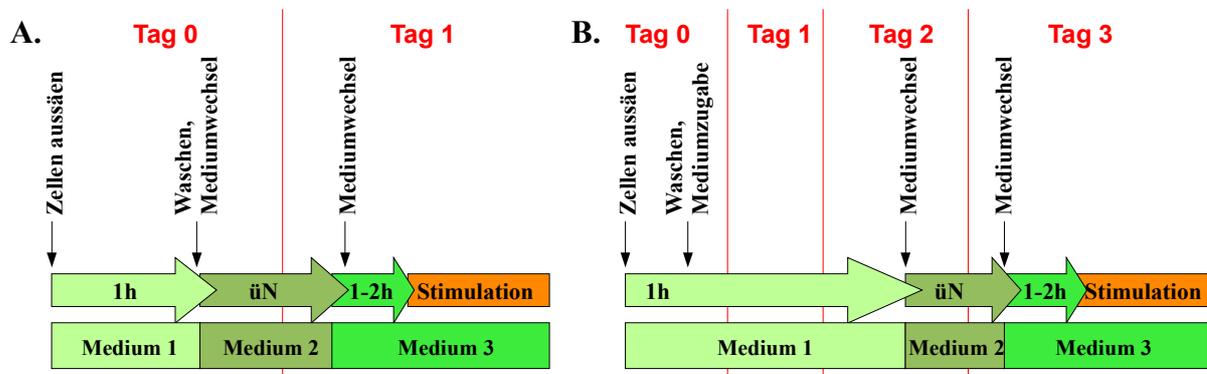


Abbildung 2.3: Monolayerkultur für Analysen am Tag 1 (A.) und am Tag 3 (B.)

In dieser Arbeit wurden Monolayerkulturen am Tag 1 und Tag 3 mit IL-6 stimuliert und

analysiert. Um die Wirkungen anderer Wachstumsfaktoren und/oder Zytokine, die sich im Serum befinden könnten, auszuschließen, wurden die Zellen ab dem Tag vor der Stimulation in serumfreien Medien kultiviert. Eine schematische Darstellung der Versuchsabläufe ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

2.1.4 Sandwichkultur

Material: Collagen I, DMEM (10×), *Kollagen-Lösungen für Sandwichbeschichtung für die untere und obere Schicht*

Durchführung:

- Beschichtung des Mini-Bioreaktors (untere Schicht):

Je 1 ml Kollagen-Lösung (1 mg/ml) wurde in jedes Well eines 6-Well-Bioreaktors gegeben und für 90 Minuten bei 37°C polymerisiert. Anschließend wurde das Medium 1 für mindestens eine Stunde zum Äquilibrieren dazugegeben. Die Platten können auch einen Tag früher beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt werden, jedoch sind längere Zeiten nicht zu empfehlen.

- Aussaat der Zellen:

Die Aussaat der Zellen erfolgte am Tag 0 wie bei der Monolayerkultur.

- Beschichtung des Mini-Bioreaktors (obere Schicht):

Am Tag 1 wurde das Medium abgesaugt und je 1 ml Kollagen-Lösung (0,4 mg/ml) in jedes Well gegeben. Die Polymerisierung fand wiederum für 90 Minuten bei 37°C statt. Anschließend wurden je 2 ml Medium 1 dazugegeben.

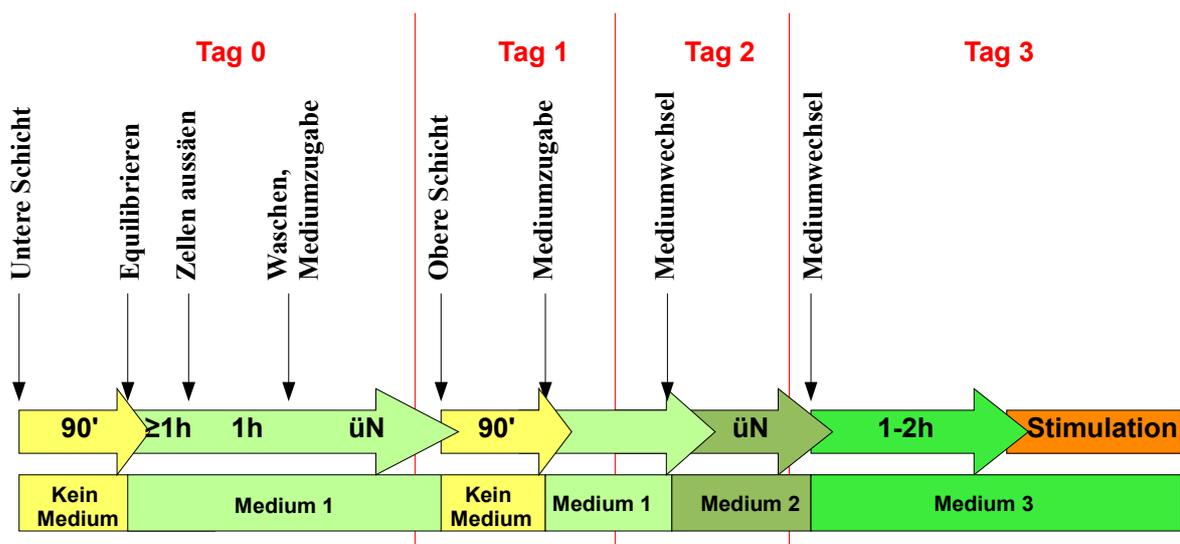


Abbildung 2.4: Sandwichkultur für Analysen am Tag 3

Der Verlauf der Beschichtung und Kultivierung der Zellen in Sandwichkultur ist in Abbildung 2.1 zu sehen.

2.1.5 Stimulation der Kulturen

Material: *IL-6-Stammlösung, PAO-Arbeitslösung*

Durchführung:

- Behandlung mit PAO:

Das Protokoll wurde von [67] abgeleitet. In Vorversuchen wurde beobachtet, dass die PBS-G-Lösung eine Schädigung der Hepatozyten verursacht. Deswegen wurde die *PAO-Arbeitslösung* für weitere Behandlungen in Kulturmedium verdünnt. Die Inhibierung mit 5 μM PAO für 10 Minuten bei 37°C wurde als optimale Bedingung für primäre Hepatozyten bestimmt.

- Stimulation mit IL-6:

Obwohl in der Literatur verschiedene Konzentrationen von IL-6 in der Zellkultur verwendet werden, wurde für diese Arbeit 20 ng/ml eingesetzt, da diese Konzentration der physiologischen Konzentration entspricht.

Für Proteinanalysen wurden die Zellen für 30 Minuten, 1, 2, 6 und 24 Stunden mit IL-6 ab Tag 1 oder ab Tag 3 stimuliert. Als Kontrolle wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten Proteine aus nichtstimulierten Zellen extrahiert.

- Verlauf:

Die Behandlung mit PAO erfolgte 10 Minuten vor jeder Stimulation. Da PAO selbst eine Wirkung auf die Expression einiger Proteine hat, wurden einige Kontrollwells in jeder Kultur zum gleichen Zeitpunkt vor der Proteinextraktion mit PAO behandelt (eine Stunde vor Protein- und RNA-Extraktion bzw. 30 Minuten vor Immunfärbung).

Um einen direkten Vergleich der Kulturmediumsüberstände zu erhalten, wurden die Wells mit und ohne PAO-Behandlung vor der Stimulation mit IL6 gleichzeitig gewaschen und die Medien gewechselt.

Für RNA-Extrakte wurden die Zellen eine Stunde lang mit IL-6 stimuliert, für die Immunfärbung erfolgte die Stimulation für 10 und 30 Minuten.

2.1.6 Suspensionskultur

Durchführung:

25×10^6 frisch isolierte Maushepatozyten wurden in 5 ml Medium 1 in einem 15-ml Röhrchen auf einem Roller im Inkubator für 30 Minuten mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert.

2.1.7 Fluoresceindiacetat (FDA)-Test

Um die sekretorische Aktivität und damit die Funktionalität der in Kultur gebildeten

Gallengänge zu zeigen, wurde der FDA-Test angewendet. Das Protokoll wurde von [68] abgeleitet.

Das FDA wird von Hepatozyten aufgenommen, zu Fluorescein umgebaut und in die Gallengänge transportiert. Das Fluorescein emittiert nach Anregung durch UV-Strahlung Licht mit einer Wellenlänge von 514 nm. Funktionelle Gallengänge erscheinen dann unter einem Fluoreszenzmikroskop als leuchtende Strukturen.

Material: *FDA-Stammlösung*

Durchführung:

Die Zellen wurden mit 0,5 µg/ml FDA in Kulturmedium für 10-15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Wells zweimal mit Medium gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Filtersatz 44 (grün)) fotografiert.

2.1.8 Annexin V-Test

Der Annexin-V-Test ist eine Standardmethode zur Markierung sterbender Zellen. Annexin-V bindet sowohl an apoptotische als auch an nekrotische Zellen, während Propidiumiodid über phosphatidylserine, das bei sterbenden Zellen von der zytoplasmatischen in die äussere Membranschicht gelangt, die DNA in nekrotischen Zellen färbt.

Material: *Annexin-V-Färbelösung*

Durchführung:

Bei Verwendung des vom Hersteller empfohlenen HEPES-Puffer zeigten sich negative Wirkungen auf die Hepatozyten. Es stellte sich heraus, dass mit *Medium 1* anstelle des Puffers gute Ergebnisse erreicht werden können.

Die Membran des Bioreaktors mit den Zellen wurde mithilfe eines Skalpell in kleine Stücke geschnitten, die mit einer Pinzette in eine 24-Well-Platte übertragen wurden. Nach Zugabe von 150µl *Färbelösung* wurden die Zellen für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz unter dem Mikroskop detektiert (Filtersatz 44 für Annexin-V und Filtersatz 43 für Propidiumiodid).

2.1.9 Live/Dead-Test

Der Live/Dead-Test ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Fluoreszenzmarkierung von lebenden und toten Zellen mittels Calcein AM und Ethidium Homodimer. Lebende Zellen zeigen Esterase-Aktivität, die an dem enzymatischen Umbau vom nichtfluoreszentschem Calcein AM zu fluoreszierendem Calcein beobachtet werden kann. Ethidium-Homodimer dringt in Zellen mit beschädigten Membranen ein und bindet an Nukleinsäuren

Material: Calcein AM, Ethidium-Homodimer

Durchführung:

Die Zellen wurden im Kulturmedium mit 1:1000 Calcein AM und 1:1000 Ethidium-Homodimer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz unter dem Mikroskop detektiert (Filtersatz 44 für Calcein AM und Filtersatz 43 für Ethidium-Homodimer).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion

Die Etablierung der RNA-Extraktion für die Sandwichkultur ist Teil dieser Arbeit (siehe auch Kapitel 3.2.2).

Material: RNeasy Mini Kit, *PBS*

Durchführung:

Alle Lösungen wurden in *DEPC-Wasser* angesetzt.

- Lyse der Zellen

Die Zellen aus Monolayerkulturen wurden zweimal mit kaltem (4°C) *PBS* gewaschen und in 600 µl RLT-Puffer aus dem Rneasy Mini Kit (Qiagen) abgeschabt.

Die Zellen aus Sandwichkulturen wurden ebenfalls zweimal mit kaltem *PBS* gewaschen. Danach wurde das gesamte Sandwich mithilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 2-ml Eppendorf-Gefäße transferiert. Nach Zentrifugation (1 min, 7500 U/min, 4°C) wurde das restliche Medium und Kollagen entfernt und das Pellet in 600 µl Lysepuffer homogenisiert.

- Aufreinigung und Ethanol-Fällung

Die nächsten Schritte der Aufreinigung erfolgten nach dem Qiagen-Protokoll mit einem Elutionsvolumen von 40 µl. Da der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ (siehe Kapitel 2.2.2) in der Regel zu gering war, wurde für alle Proben eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Dafür wurden die Proben mit 1/10 Vol 5M NaCl und 3 Vol 96%igem Ethanol versetzt, für eine Stunde bei -80°C inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 13000 U/min, und 4°C für 10 Minuten wurde das Pellet getrocknet und in 40 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.2 Quantitative Nukleinsäurebestimmung

Zur Quantifizierung der RNA wurde mit dem Spektrometer *Nanodrop ND-1000* die

Absorption bei 260nm bestimmt. Eine Absorption von $A_{260nm}=1,0$ entspricht ca. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA. Des Weiteren wurden die Absorptionen bei 230 nm und 280 nm gemessen und die Quotienten A_{260nm}/A_{230nm} und A_{260nm}/A_{280nm} ermittelt. Bei einer reinen Präparation liegen der Wert von A_{260nm}/A_{230nm} zwischen 1,8 und 2,2 und von A_{260nm}/A_{280nm} bei 2.

2.2.3 Qualitätskontrolle der RNA

Zur Qualitätskontrolle wurden je 500 ng RNA in einem 1,2%igen Agarosegel getrennt. Bei guter Qualität der RNA (keine Degradation) können die 28S rRNA und 18S rRNA-Banden distinkt detektiert werden.

2.2.4 Reverse Transkription

Material: MLV-Reverse Transkriptase, 5 \times M-MLV-Puffer, Rekombinantes RNAsin (Rnase-Inhibitor), Oligo-dT-Primer, *dNTP-Mix*.

Durchführung:

1 μg RNA wurde mit 0,5 μl Oligo-dT-Primer vermischt, mit DEPC-Wasser auf 10 μl aufgefüllt und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 10 μl Mastermix (4 μl dNTP-Mix, 4 μl 5 \times M-MLV-Puffer, 0,5 μl RNAsin, 1 μl M-MLV-Reverse Transkriptase, 0,5 μl DEPC-Wasser) dazugegeben und die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.5 Primerentwurf

Die genomischen und cDNA-Sequenzen der untersuchten Gene wurden der freien Datenbank MGI – Mouse Genome Information² – entnommen. Die Primersequenzen wurden mit dem Programm *Primer3*³ entworfen [69]. Um zu testen, ob sich zwischen den Forward- und Reverse-Primern (mindestens) ein Exon befindet, wurden die genomische und die cDNA-Sequenz mithilfe der Blast-Funktion verglichen, die auf der Internetseite des NCBI⁴ [70] verfügbar ist. Des Weiteren wurden die möglichen sekundären Strukturen der Forward-, Reverse-Primer und des Primerpaares mit der Software *Netprimer*⁵ ermittelt, und das Paar mit der geringsten Wahrscheinlichkeit zur Sekundärstrukturbildung ausgewählt.

Die Datenbank und die verwendeten Programme sind im Internet frei verfügbar.

Die Primer wurden von der Firma Operon synthetisiert.

²<http://www.informatics.jax.org/>

³<http://primer3.sourceforge.net/>

⁴<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>

⁵<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>

2.2.6 PCR

Material: PCR-Kit, *dNTP-Mix*, Primer (siehe Anhang E).

Durchführung:

Der PCR-Ansatz ist in der Tabelle 2.1 beschrieben, die PCR wurde mit folgenden Parameter durchgeführt:

- | | | |
|---------------------------|--------|------|
| 1. Initiale Denaturierung | 5 min | 95°C |
| 2. Denaturierung | 30 sek | 95°C |
| Annealing der Primer | 30 sek | |
| Elongation | 30 sek | 72°C |
| 3. Finale Elongation | 5 min | 72°C |

(Für die Annealing-Temperatur und die Anzahl der Zyklen siehe Anhang E)

Tabelle 2.1: PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen (µl)
dNTP-Mix	1
10x Puffer	1
MgCl ₂ -Lösung	0,4
fw Primer	0,2
rv Primer	0,2
Taq Polymerase	0,05
dH ₂ O	4,15

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Material: DNA-Größenstandard, Ethidiumbromid, *TBE-Puffer* (1×), *Ladepuffer für Nukleinsäuren* (5×)

Durchführung:

Der *TBE-Puffer* (1×) wurde für die Agarose-Gele sowie als Laufpuffer für die Elektrophorese eingesetzt. Die Gellösung (1,2% Agarose in TBE (1×)) wurde in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach der Abkühlung auf ca. 60°C wurde 1:10.000 Ethidiumbromid dazugegeben, und anschließend wurde die Lösung in einen Gelträger gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese lief ca. eine Stunde bei 5 V/cm, und die aufgetrennten Proben wurden mit dem Geldokumentationssystem (mit Bandpass-Filter: 540–640 nm) unter UV-Licht fotografiert.

2.2.8 Mikroarrays

Die RNA-Proben (2 µg Gesamt-RNA) wurden der Firma Miltenyi Biotec geschickt, die folgende Experimente durchführte: Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA, Amplifikation der RNA, Hybridisierung und Scannen der Mikroarrays, Bild- und Datenauswertung. Die Dokumentation der Analysen befinden sich im Anhang F1.

2.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.3.1 Präparation von Gesamtproteinextrakten und quantitative Proteinbestimmung

Die Etablierung der RNA-Extraktion für die Sandwichkultur ist Teil dieser Arbeit (Siehe auch Kapitel 3.2.2)

Material: BCA Protein Assay Kit, Lysepuffer für Proteine (frisch hergestellt)

Durchführung:

- Adhärente Kulturen

Die Lyse wurde wie bei der RNA-Extraktion (Kapitel 2.2.1) durchgeführt, allerdings mit 350 µl Lysepuffer für Monolayerkulturen und je nach Pelletgröße mit 150-300 µl für Sandwichkulturen. Die Lysate wurden für 10-15 Sekunden sonifiziert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 13.000 U/min und 4°C wurde der Überstand (Proteinextrakt) in ein anderes Gefäß transferiert und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Kit (Pierce) laut Hersteller-Protokoll bestimmt. Die Extrakte wurden bei -20°C eingefroren.

- Suspensionkultur

Die Zellen wurden in einem 15 ml-Röhrchen für 5 Minuten bei 50g zentrifugiert, das Medium abgesaugt, das Pellet mit kaltem (4°C) PBS gewaschen, in 1-2 ml Lysepuffer homogenisiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei der Extraktion der Proteine aus adhärenen Kulturen.

2.3.2 Präparation von Zytoplasma- und Kernextrakten

Material: PBS, Zytoplasmapuffer und Kernpuffer (frisch angesetzt)

Durchführung:

Das Protokoll nach [71] und [72] wurde angepasst und folgendermaßen durchgeführt:

Der Bioreaktor wurde auf Eis gestellt, das Medium verworfen oder für weitere Analysen entnommen und die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen. Für Monolayerkulturen wurde je 1 ml kaltes PBS in jedes Well gegeben, die Zellen abgeschabt und in vorgekühlte Gefäße transferiert. Bei den Sandwichkulturen wurde das Sandwich ohne Zugabe von PBS mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße transferiert. Die Proben wurden für eine Minute bei 7500 U/min, 4°C zentrifugiert und das PBS abgesaugt (Monolayer) oder das Medium und die Kollagenreste vorsichtig entfernt (Sandwich). Die Pellets wurden in je 100 µl Zytoplasmapuffer resuspendiert und für 15

Minuten auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 13 000U/min, 4°C wurden die Überstände (Zytoplasmaextrakte) in neue Gefäße überführt. Die Pellets wurden mit ca. 100 µl kaltem *PBS* gewaschen, in 100 µl Kernpuffer homogenisiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert, 15 Minuten bei 13.000U/min, 4°C zentrifugiert, und die Überstände (Kernextrakte) vorsichtig abgenommen. Alle Extrakte wurden zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

Da die Pufferzusammensetzungen mit der BCA-Bestimmung nicht kompatibel sind und die Gesamtproteinmenge daher nicht bestimmt werden konnte, wurden für Western Blot jeweils 20 µl Zytoplasma- und Kernextrakt verwendet.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Material: Protein-Größenstandard, *Ladepuffer für Proteine*, *Gellösung*, *SDS-Laufpuffer (1×)*

Durchführung:

Das Trenngel wurde gemischt und sofort in die zusammengebaute Gelapparatur gegossen. Die Geloberfläche wurde mit Wasser überschichtet. Nach ca. 40 Minuten wurde das Wasser mit einem dünnen Filterpapier abgesaugt, die Kämme wurden eingesetzt, die Lösung für das Ladungsgel vorbereitet und gegossen. Nach weiteren 40 Minuten konnte das Gel beladen werden. Als Laufpuffer wurde der *SDS-Laufpuffer* verwendet.

Je 20 µg Gesamtprotein oder 20 µl Zytoplasma- und Kernextrakt wurden mit *Ladepuffer für Proteine* vermischt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Die Elektrophorese-Einstellungen waren 30mA/Gel, 300 V, 20W, 2h, wobei die Stromstärke konstant bleiben sollte.

Einige Western Blots wurden nach einem selbstentwickelten Verfahren semiquantitativ ausgewertet (siehe [73] und Kapitel.3.2.1). Für die Eichreihe wurde ein Suspensionsextrakt aus frisch isolierten Hepatozyten verwendet, die mit 20 ng/ml IL-6 stimuliert wurden. Die Auswertung ist in Kapitel 2.4.1. beschrieben.

2.3.4 Western blot

Material: 0,45 µm Nitrozellulose-Blotmembran, Filterpapier, Imperial™ Protein Stain, AmphiGreen Fluo, *Ponceau S-Lösung*, *Transferpuffer*, *Entfärbelösung für AmphiGreen*

Durchführung:

Nach der SDS-PAGE wurden das Gel, das Filterpapier und die Blotmembran für 20 Minuten in kalten Transferpuffer äquilibriert. Der Blottransfer erfolgte in einer Semi-dry-Blotkammer mit den Einstellungen 25 V, 500 mA, 45 mW/cm², 15 Minuten, wobei die Leistung konstant

bleiben sollte. Die Qualität des Transfers wurde nach zwei Protokollen überprüft:

Protokoll 1

Die Membran wurde für 5 Minuten auf dem Wipptisch mit Ponceau S-Lösung inkubiert und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde sie unter Weißlicht fotografiert und in TBST entfärbt.

Protokoll 2

Die Membran wurde für 30 Minuten auf dem Wipptisch mit AmphiGreen Fluo-Lösung inkubiert und mit 30%igem Methanol gewaschen. Anschließend wurde sie unter UV-Licht fotografiert (mit SYBR-Green-Filter) und mit Entfärbelösung gewaschen.

2.3.5 Immundetektion

Material: *TBST, Blocklösung, Verdünnungspuffer für Antikörper* (siehe Tabelle im Anhang D), *ECL-Lösung*

Durchführung:

Die Blocklösung, die Verdünnungspuffer für Antikörper sowie die ECL-Lösung wurden frisch hergestellt.

Die Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocklösung. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten in TBST gewaschen und über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4°C inkubiert. Alle verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung und den Verdünnungspuffern sind im Anhang D aufgelistet. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal in TBST gewaschen, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert, und erneut dreimal in TBST gewaschen. Alle Inkubationen und Waschschrte wurden auf dem Wipptisch durchgeführt. Schließlich wurde die Membran in *ECL-Lösung* mit dem System *Molecular Imager ChemiDoc XRS* und der Software *QuantityOne* von BioRad fotografiert. Die Belichtungszeiten waren zwischen 20 und 240 Sekunden, je nach Intensität des Signals.

2.3.6 Reprobing

Material: *Strip-Puffer*

Durchführung:

Die Membran wurde nach der ECL-Entwicklung mit TBST gewaschen, mit Strip-Puffer für

eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit Wasser und dreimal mit TBST gewaschen und für 30 Minuten erneut geblockt.

2.3.7 Immunfluoreszenz

Die obere Schicht der Standard-Sandwichkultur hat eine Kollagen-Konzentration von 1mg/ml [4] und ist dadurch ein Hindernis für die Diffusion von großen Molekülen, z. B. Antikörpern. Deswegen war es nötig, die Kultur zu optimieren, um eine Immunfärbung durchführen zu können. Die optimierte Kultur wurde in Zusammenarbeit mit Isabell Schulz und Mario Keller etabliert (siehe Kapitel 3.2.2).

Material: Phalloidin, *Mounting-Puffer*, *Antikörperlösung für Immunfärbung*, *DAPI-Lösung*, *Fixierungslösung*

Durchführung:

Die Immunfärbung wurde nach dem Protokoll von Cell Signaling Technology⁶ mit folgenden Anpassungen durchgeführt: Die Fixierung und der Block fanden in 6-Well-Bioreaktoren statt. Dann wurde die Teflonmembran jedes Wells des Bioreaktors mithilfe eines Skalpells in 6-8 kleine Stücke geschnitten, von denen jedes mit der Pinzette in ein Well einer 24-Well-Platte übertragen wurden. Die weiteren Schritte erfolgten in der 24-Well-Platte. Anschließend wurde die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (Filtersatz 44 für Alexa-488, Filtersatz 43 für Alexa-555, Filtersatz 49 für DAPI).

2.4 Bildverarbeitung und Auswertung

Alle Bilder wurden zunächst im herstellerspezifischen Format aufgenommen und dann in das Format TIFF (bei 16 Bit Farbtiefe pro Farbkanal) konvertiert. Bei Fotos (Ausnahme: Belichtungsreihen), die quantifiziert wurden, wurde eine Überbelichtung vermieden. Helligkeits-, Kontrast- und Gammakorrektur wurden nur zur Illustration oder in Form nondestruktiver Ebenen in *Adobe® Photoshop®* angewendet.

2.4.1 Semiquantitativer Western Blot

Die quantitative Auswertung von Western Blots wurde nach der selbst etablierten Methode [73] wie folgt durchgeführt:

Quantifizierung von ECL-Bildern

Für die untersuchten Proteine und das Housekeeping-Protein wurde jeweils das ECL-Bild

⁶<http://www.cellsignal.com/support/protocols/IF.html>

analysiert. Die Analyse der ECL-Bilder wurde mit dem frei erhältlichen Programm *ImageJ* durchgeführt. Dabei wurden die integrierten „Gel Analysis“-Funktionen benutzt. Der Hintergrund wurde mit dem ebenfalls in *ImageJ* implementierten „Rolling Ball“-Verfahren korrigiert, mit einem „Ball“-Radius, der der vierfachen Breite einer Bande entspricht.

Kalibrierkurve

Nach Quantifizierung der ECL-Bilder wurde durch die Werte der Verdünnungsreihe eine Regressionskurve gelegt. Im allgemeinen Fall war dies eine Hyperbel, wenn jedoch keine Sättigung sichtbar war, wurde eine Gerade verwendet. Für die hyperbolische Regression wurde ein *Python*-Skript [73] benutzt, das eine „Least squares“-Optimierung der Kurvenparameter vornimmt.

Über die Regressionskurve wurde den Ergebnissen aus *ImageJ* je eine äquivalente relative Proteinmenge zugeordnet sowohl für die untersuchten Proteine als auch für das Housekeeping-Protein. Der Wert für jedes Protein wurde anschließend auf den des Housekeeping-Proteins der gleichen Probe normiert. Weitere Erläuterungen zum Prozess sind in Kapitel 3.2.1 dargestellt.

2.4.2 Mikroarrays

Die Ergebnisse des Mikroarrays wurden von Miltenyi Biotec bioinformatisch ausgewertet. Folgende Analysen wurden durchgeführt: Vorbereitung der Daten, Korrelationsanalyse, Ermittlung der unterschiedlich-regulierten Gene. Die Dokumentation der Analysen befindet sich im Anhang F2.

2.4.3 Statistik

Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede zwischen Messwerten wurde der t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Da bis jetzt keine Sandwichkultur für murine Hepatozyten beschrieben wurde, war die Etablierung einer solchen Kultur notwendig, um murine Zellen unter ähnlichen Bedingungen kultivieren zu können⁸. Als Ausgangspunkt wurde die Kultur unter analogen Bedingungen wie bei der für Rattenhepatozyten beschriebenen Sandwichkultur angesetzt [4]. Des Weiteren wurden Protokolle für RNA- und Proteinextraktion sowie Immunfärbung in der Sandwichkultur etabliert und zum besseren Vergleich der Proteinprofile in verschiedenen Kulturen eine semiquantitative Western Blot-Methode weiterentwickelt. Mithilfe der entwickelten Protokolle wurde der Interleukin-6-Signalweg in Monolayer- und Sandwichkulturen von murinen Hepatozyten charakterisiert.

3.1 Kultursysteme

3.1.1 Allgemeines

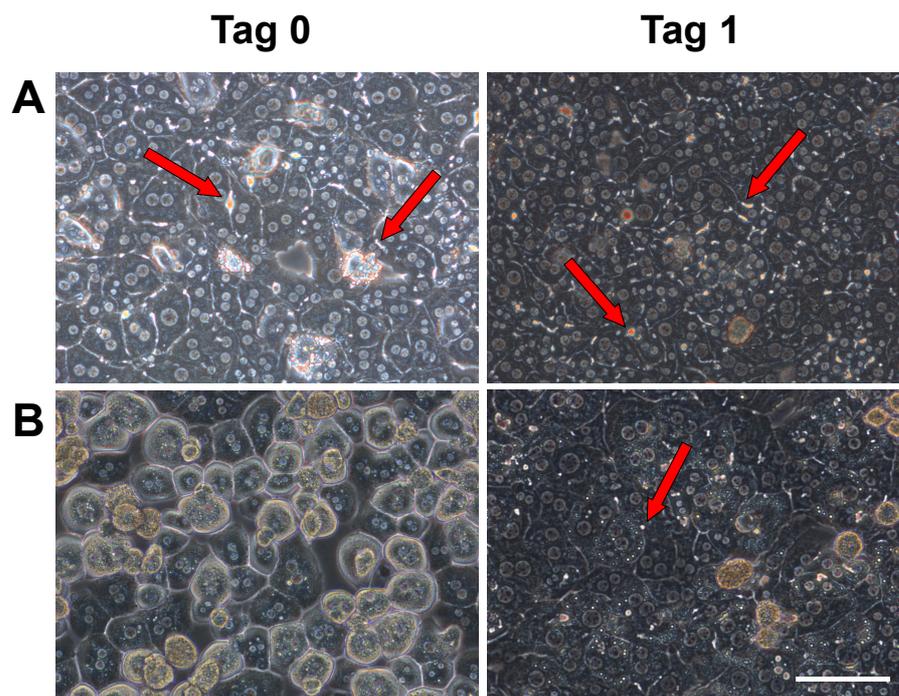


Abbildung 3.1: **Monolayerkultur** (A) im Bioreaktor, (B) in der Platte. Messbalken = 100 µm. Aufnahmen am Tag 0 einige Stunden nach Aussaat; Rote Pfeile: Gallenkanälchen.

Ein wichtiger Aspekt bei Hepatozytenkulturen ist die Sauerstoffversorgung, die für die Kulturen von metabolisch sehr aktiven Zellen meistens eine Limitierung darstellt [74]. Unter hypoxischen Bedingungen stellt sich ein anaerober, nicht physiologischer Stoffwechsel ein [33]. Daher wurden für die in dieser Arbeit untersuchten Hepatozytenkulturen

⁸Schulz I, Keller M, Heidebrecht F, nicht veröffentlichte Ergebnisse

Minibioreaktoren [35] verwendet, deren Geometrie den klassischen Kulturplatten entspricht, deren Boden aber aus einer gaspermeablen Teflonmembran besteht, die eine Sauerstoffversorgung der Zellen auch von unten ermöglicht. Der Aufbau der Bioreaktoren ist in Kapitel 2.1.2. erklärt. Die Hepatozyten adhäreren schneller (Siehe Abbildung 3.1, Tag 0) und bilden mehr Gallenkanälchen (Abbildung 3.1, rote Pfeile) in Bioreaktoren als auf einer Kulturplatte.

Die beiden Kultursysteme (Monolayer und Sandwich) wurden zunächst bezüglich folgender Aspekte charakterisiert: Morphologie, Vitalität der Zellen in Kultur, Polarität der Membran, Bildung und Funktionalität von Gallenkanälchen, Dedifferenzierung. Da sich die Eigenschaften der Zellen während der Kulturdauer ändern, war es notwendig, bestimmte Zeitpunkte für weitere Analysen festzulegen. Die Zellen in der Monolayerkultur dedifferenzieren sehr schnell und werden deswegen üblicherweise schon am ersten Tag nach der Aussaat mit Wachstumsfaktoren oder Zytokinen stimuliert [24]. Daher wurde in der Monolayerkultur die Polarität und die Reaktion der Zellen auf IL-6 am Tag 1 untersucht.

Die wichtigste strukturelle Eigenschaft der Sandwichkultur ist die Polarität. Eine Besonderheit der Leberzellen ist, dass die apikalen und sinusoidalen Membranregionen sowie die Zell-Zell-Kontakte auch während der Zellteilung bei der Leberregeneration erhalten bleiben [75]. Da aber die Polarität der Hepatozyten bei der Isolierung aus der Leber zerstört wird, muss eine Reetablierung der Polarität in Kultur stattfinden. Die Neubildung der Polarität in Kultur ist ein Prozess, der Ähnlichkeiten mit der Polarisierung der Hepatozyten während der embryonalen Entwicklung aufweist [76], [77], allerdings ist über die entsprechenden molekularen Mechanismen wenig bekannt. Eine Hypothese besagt, dass die Entwicklung der Polarität durch Zell-Zell-Kontakte eingeleitet wird. Demnach ermöglicht E-Cadherin die Bildung von Vorläuferkomplexen, die sich anschließend zu separaten *Adherens* und *Tight Junctions* entwickeln. Aktin bindet an diese apikalen Komplexe, und das Zytoskelett reorganisiert sich [77], [78]. Andere Arbeiten zeigen, dass Zellen ohne E-Cadherin zwar apikal-basale Polarität etablieren, die Gallenkanälchen sich aber nicht zu einem Netzwerk weiterentwickeln können [79]. In der in dieser Arbeit etablierten Sandwichkultur ist der Polarisierungsprozess in der Regel am dritten Tag nach der Isolierung abgeschlossen (ZO-1 ist nachweisbar und umgibt den apikalen Bereich), daher wurde dieser Zeitpunkt für die Stimulation gewählt. Als Vergleich dazu wurde die zu diesem Zeitpunkt bereits dedifferenzierte Monolayerkultur ebenfalls am Tag 3 stimuliert und analysiert.

Als Nachweis der Polarität wurde die Lokalisierung folgender Proteine betrachtet: E-Cadherin und β -Catenin als laterale Marker, Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) als apikaler Marker und ZO-1 als Bestandteil der *Tight Junctions* [80], [16]. Zusätzlich wurde die Verteilung bzw. der

Umbau des Zytoskeletts anhand einer Tubulin- und Actin-Färbung untersucht.

3.1.2 Monolayerkultur

Allgemeine Charakterisierung

Auf einer Monolayerbeschichtung adhärieren die Hepatozyten sehr schnell, schon am ersten Tag nach der Aussaat ist die typische hexaedrische Morphologie erkennbar (Abbildung 3.2 A1). Die Dichte der Zellschicht ist am Rand eines Wells geringer (siehe Abbildung 3.2 A, links und rechts). Die Zellen, die keine freien Oberflächen zur Adhäsion finden, sterben, was sich in der Mitte des Wells öfter beobachten lässt. Zellen, die aufgrund der geringeren Zelldichte am Rand keine Zell-Zell-Kontakte bilden können (siehe gelber Pfeil in Abbildung 3.2 A1 rechts), breiten sich stark aus.

Die Zellsuspension (Zellen frisch nach der Isolierung) enthält bereits eine Anzahl an toten oder sterbenden Zellen (Siehe rote Färbung in Abbildung 3.2 B1). Nach einer Stunde sollten die meisten Zellen adhärirt sein, obwohl sie in den ersten Stunden nach der Aussaat noch die für nicht-adhärirte Zellen typische runde Form aufweisen. Tote Zellen können auch adhärieren, allerdings langsamer. Daher reduziert eine kürzere Adhäsionszeit die Anzahl an toten Zellen in der Kultur. Adhärenente Zellen, die in den ersten Stunden nach der Isolierung sterben, bleiben abgerundet (siehe Abbildung 3.2 B2) im Gegensatz zu anderen Zellen, die erst später während der Kultivierung sterben (siehe Abbildung 3.2 B3).

Charakteristisch für die Monolayerkultur ist eine schnelle Dedifferenzierung. Schon am zweiten Tag nach der Aussaat zeigen viele Zellen (vor allem in den Randbereichen der Wells) einen veränderten Phänotyp: Die Zellen haben kaum noch Membrankontakte zu den benachbarten Zellen und breiten sich aus (siehe Abbildung 3.2 A2). Das Ausbreiten einer Zelle geschieht relativ schnell (siehe Abbildung 3.2 C).

* *

Die Kultur ist im 6-Well-Format nicht homogen. Gründe dafür können die natürliche Inhomogenität der Hepatozyten in der Leber [7], aber auch die Collagenbeschichtung sein. Durch Adhäsion der Collagenlösung an den Seitenwänden der Wells entsteht eine leicht konkave Schicht, was dazu führt, dass die Zellschicht in der Mitte dichter ist als am Rand.

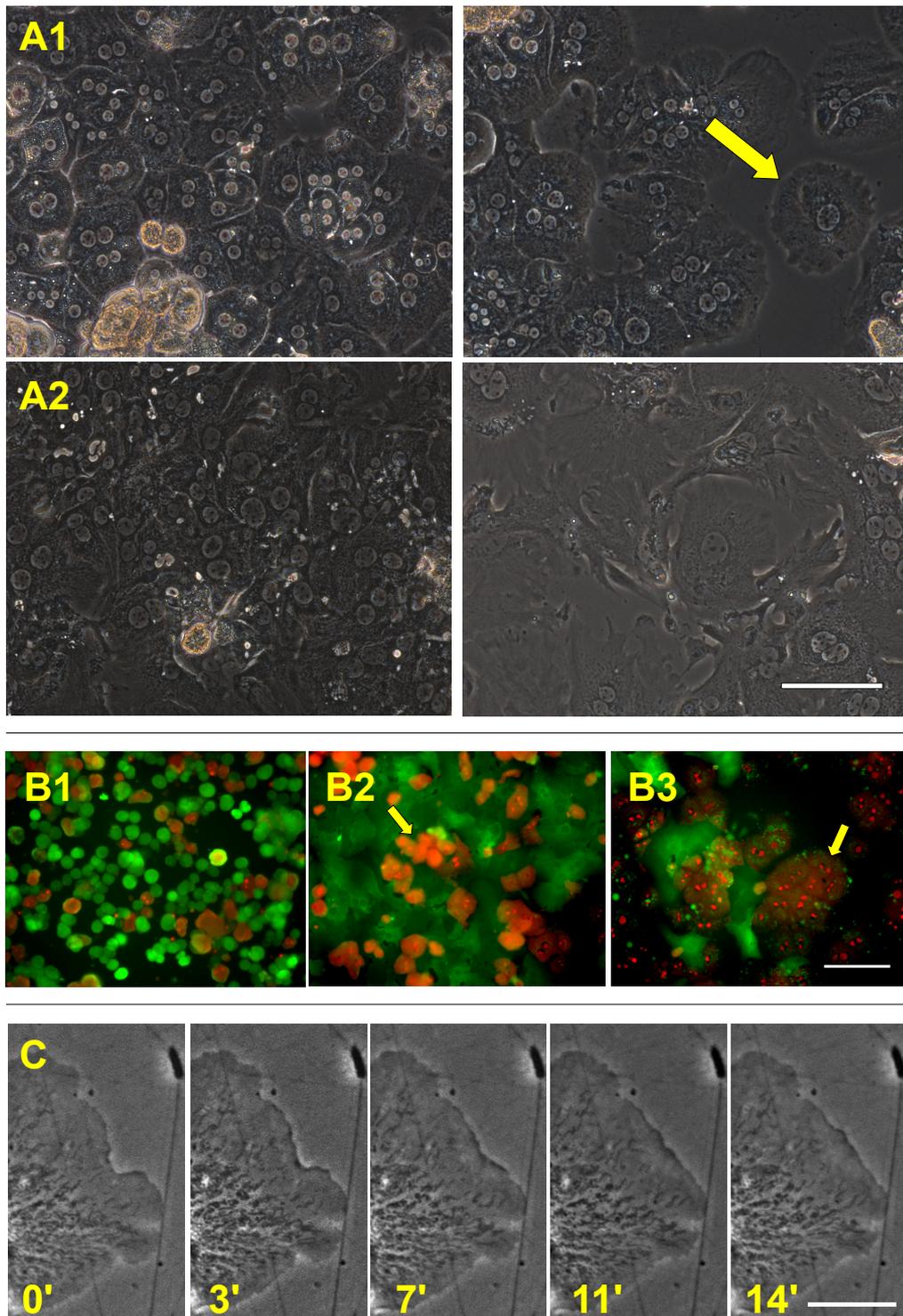


Abbildung 3.2: **Monolayerkultur.** (A): Phasenkontrastbilder in der Mitte (links) bzw. am Rand eines Wells (rechts) am Tag 1 (A1) und am Tag 2 (A2), Pfeil: ausgebreitete Zelle, Messbalken 100 μm ; (B): Fluoreszenzaufnahmen eines „Live/Dead“-Assays (tote Zellen sind rot gefärbt). Frisch ausgesäte Zellen (B1); Kultur am Tag 1 mit Zellen, die bereits vor der Aussaat abgestorben waren (B2) und Zellen, die während der Kultivierung gestorben sind (B3). Pfeile: abgestorbene Zellen, Messbalken 200 μm ; (C): Beweglichkeit der Zellen in der Monolayerkultur. Aufnahmen am Tag 1. Messbalken 50 μm .

Die Dedifferenzierung der Zellen in der Monolayerkultur und der damit verbundene Verlust der charakteristischen Stoffwechselaktivität ist seit längerer Zeit bekannt [17]. Dedifferenzierende Epithelzellen verlieren ihre Polarität und können entweder durch Apoptose sterben oder durch eine epithelial-mesenchymale Transition zu Fibroblasten werden [81]. Möglicherweise haben die Zellen, die während der Kulturzeit sterben, trotz Nachbarn keine Junctions mehr und dadurch auch keine Polarität, können aber aus Platzmangel nicht transformieren.

Polynuklearität in der Monolayerkultur

Polynuklearität und Polyploidie sind keine ungewöhnlichen Eigenschaften von Hepatozyten *in vivo*, wobei gezeigt wurde, dass der Ploidiegrad mit dem Alter steigt. So sind in der fötalen Leber die Mehrheit der Hepatozyten mononuklear und diploid, in der jungen adulten Leber dagegen ist ein gewisser Prozentsatz der Zellen binuklear und tetraploid [82]. Auch andere Faktoren können die Ploidie erhöhen, wie zum Beispiel eine partielle Hepatektomie oder einige Krankheiten wie virale Hepatitis oder Leberzirrhose. Hohe Ploidie ist ein Zeichen von Reifung oder terminaler Differenzierung und Seneszenz [83], [84].

In der Literatur sind zwei Hypothesen beschrieben, wie die Polynuklearität entstehen kann. Nach der ersten Hypothese ([82], [83]) findet in einigen Zellen eine Kernteilung ohne Zytokinese statt. Einige Studien haben gezeigt, dass mononukleare diploide Hepatozyten eine acytokinetische Mitose eingehen, und die daraus hervorgehenden binuklearen tetraploiden Zellen können bei der nächsten Teilung eine vollständige Mitose vollziehen. Die Tochterzellen sind dann mononuklear tetraploid [85]. Obwohl die polyploiden Zellen eine reduzierte proliferative Kapazität aufweisen, ermöglicht die unvollständige Mitose eine Steigerung der metabolischen Leistung ohne den Energieaufwand für eine Zytokinese [86]. Die zweite Hypothese besagt, dass die Hepatozyten miteinander fusionieren können. Derartige Ereignisse konnten zum Beispiel nach Behandlung mit Miteomycin [87], bei einer viralen Infektion mit HCV/HIV [88] oder bei idiopathischer neonataler Hepatitis [89] nachgewiesen werden.

* *

Die Hepatozyten in Kultur sind häufig polynuklear, meistens binuklear. In allen für diese Arbeit betrachteten Kulturen wurden mono- und polynukleare Zellen beobachtet (siehe Abbildung 3.3 A1), wobei die Größe der Kerne in mononuklearen Zellen nicht immer gleich ist (rote/weiße Pfeile). Zellen mit mehr als zwei Kernen traten nur in Monolayerkulturen an späteren Tagen auf, da die Anzahl der Kerne während der Dedifferenzierung steigt (siehe Abbildung 3.3 A3).

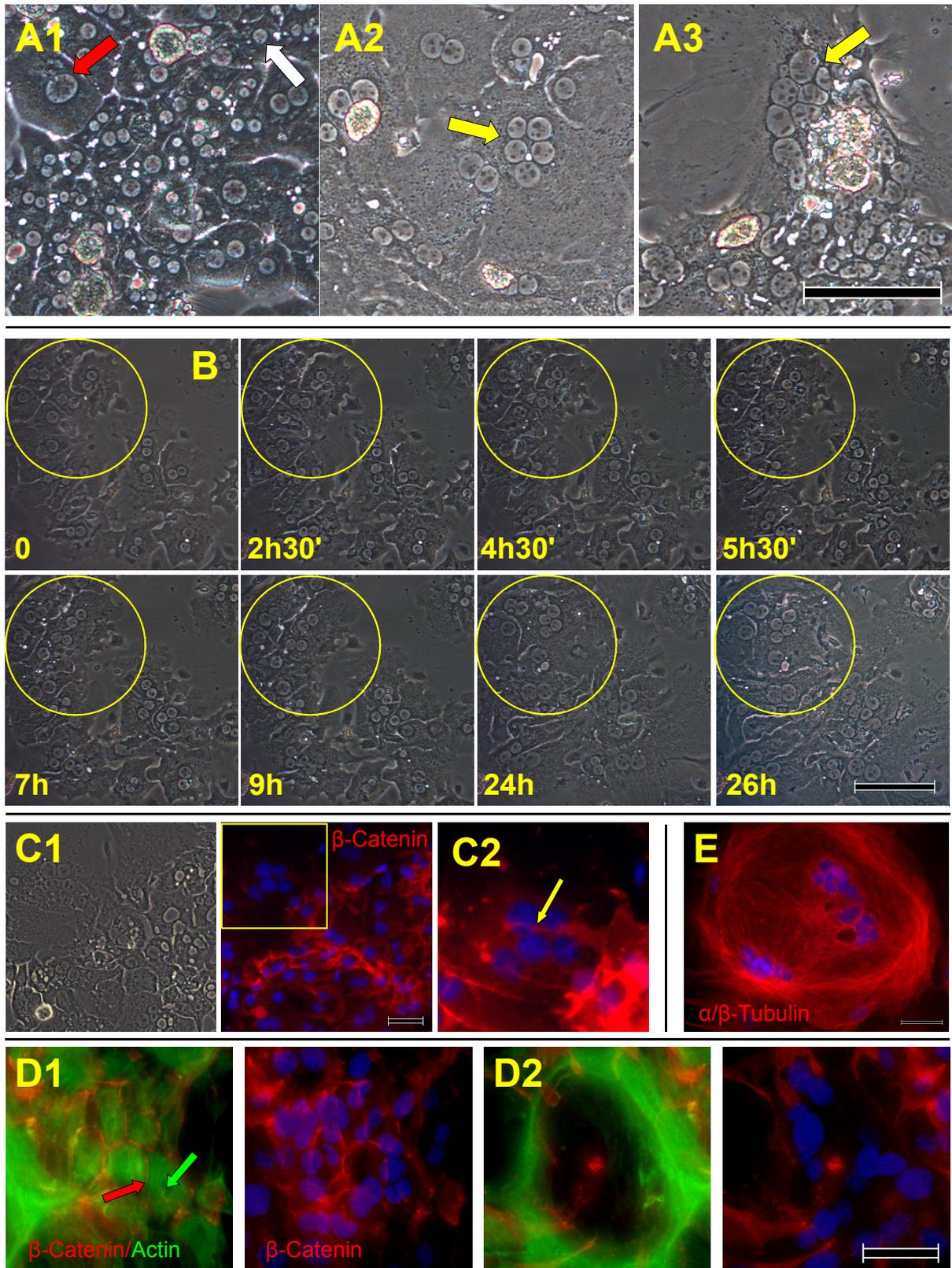


Abbildung 3.3: Polynuklearität und Zellfusion in Monolayerkultur

(A): Nuklearität der Hepatozyten in Kultur, Monolayerkultur am Tag 1 (A1); Tag 3 (A2); Tag 5 (A3). Rote Pfeile: Große Kerne in mononuklearen Zellen; Weiße Pfeile: Kleine Kerne in mononuklearen Zellen; Gelbe Pfeile: Multinukleäre Zelle. Messbalken 100 μm

(B): Morphologische Veränderungen der Zellen in Monolayerkultur am Tag 2-3. Phasenkontrastbilder, Messbalken 100 μm .

(C): Immunfärbung in Monolayerkultur am Tag 3. Übersicht (C1) und Ausschnitt (C2); β -Catenin rot; DAPI blau; Messbalken 50 μm

(D-E): Immunfärbung einer Monolayerkultur am Tag 7. Zellen mit abgegrenzten Membranen (roter Pfeil) und eigenem Actin-Zytoskelett (grüner Pfeil) (D1); Zytoskelettverbund (D2); β -Catenin rot; Actin grün; DAPI blau; Tubulinfärbung (E). α/β -Tubulin rot; DAPI blau; Messbalken 50 μm .

Um die Frage beantworten zu können, ob die Polynuklearität das Ergebnis einer unvollständigen Teilung oder einer Zellfusion ist, wurden die Hepatozyten im Zeitverlauf fotografiert (siehe Abbildung 3.3 B). Wie in dieser Abbildungsreihe zu sehen ist, bleibt die Anzahl der Kerne konstant, und die Zellen scheinen zu fusionieren. Eine Immunfärbung am Tag 3 (Abbildung 3.3 C1) zeigt nur noch eine sehr schwache β -Catenin-Expression an der Membran einiger Zellen, besonders bei stark ausgestreckten und polynuklearen Zellen. Erst nach Verstärkung des Kontrastes und Anhebung der Helligkeit kann noch eine sehr schwache Membranfärbung nachgewiesen werden (Pfeil in Abbildung 3.3 C2). An den folgenden Tagen nimmt die Expression von β -Catenin an der Membran stetig ab. Am Tag 7 (siehe Abbildung 3.3 D) gibt es nur noch wenige Zellen, die abgegrenzte Membranen aufweisen (roter Pfeil in Abbildung 3.3 D1), die Mehrheit der Zellen ist sehr stark dedifferenziert, und das Actin-Zytoskelett bildet lange zirkuläre Fasern (Abbildung 3.3 D2). Ähnliche Zytoskelett-Verbindungen zwischen Zellen zeigt auch die Tubulinfärbung in Abbildung 3.3 E.

* *

Dass die Größe der Kerne in mononuklearen Zellen nicht immer gleich ist, könnte daran liegen, dass sich die Zellen im Ploidiegrad unterscheiden (größere Kerne besitzen eine höhere Ploidie) [82]. Die Polynuklearität könnte entweder als Folge einer unvollständigen Zellteilung ([82], [83]) oder einer Fusion ([88], [89]) entstehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese der Zellfusion.

Zelldichte

Ein wichtiger Parameter, der die Eigenschaften der Kultur beeinflusst, ist die Zelldichte. Grundsätzlich lassen sich primäre Hepatozyten bei geringen Zelldichten zur Proliferation stimulieren, hohe Zelldichten bewirken hingegen Differenzierung der Zellen (hepatische Aktivität) [90]. Für eine Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren werden üblicherweise Zelldichten zwischen 10.000 und 25.000 Zellen/cm² verwendet [24], [91], [92]. Für die Reetablierung der Polarität ist es allerdings wichtig, dass die Zellen enge Kontakte zueinander

bilden können. Unter diesem Aspekt ist also eine höhere Zelldichte vorteilhaft.

* *

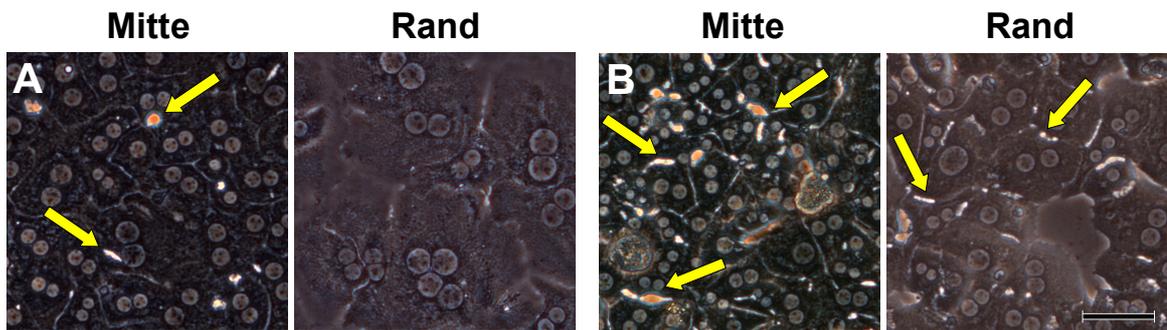


Abbildung 3.4: *Verschiedene Zelldichten in einer Monolayerkultur am Tag 1. 10.000 Zellen/cm² (A); 75.000 Zellen/cm² (B); Pfeile: Gallenkanälchen; Messbalken 50 μ m*

Bei ausreichend hohen Zelldichten bilden die Hepatozyten auch in einer Monolayerkultur Gallenkanälchen (siehe Pfeile in Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5), allerdings ist dies nicht ausreichend für die Langzeit-Erhaltung der hepatischen Funktionen⁹.

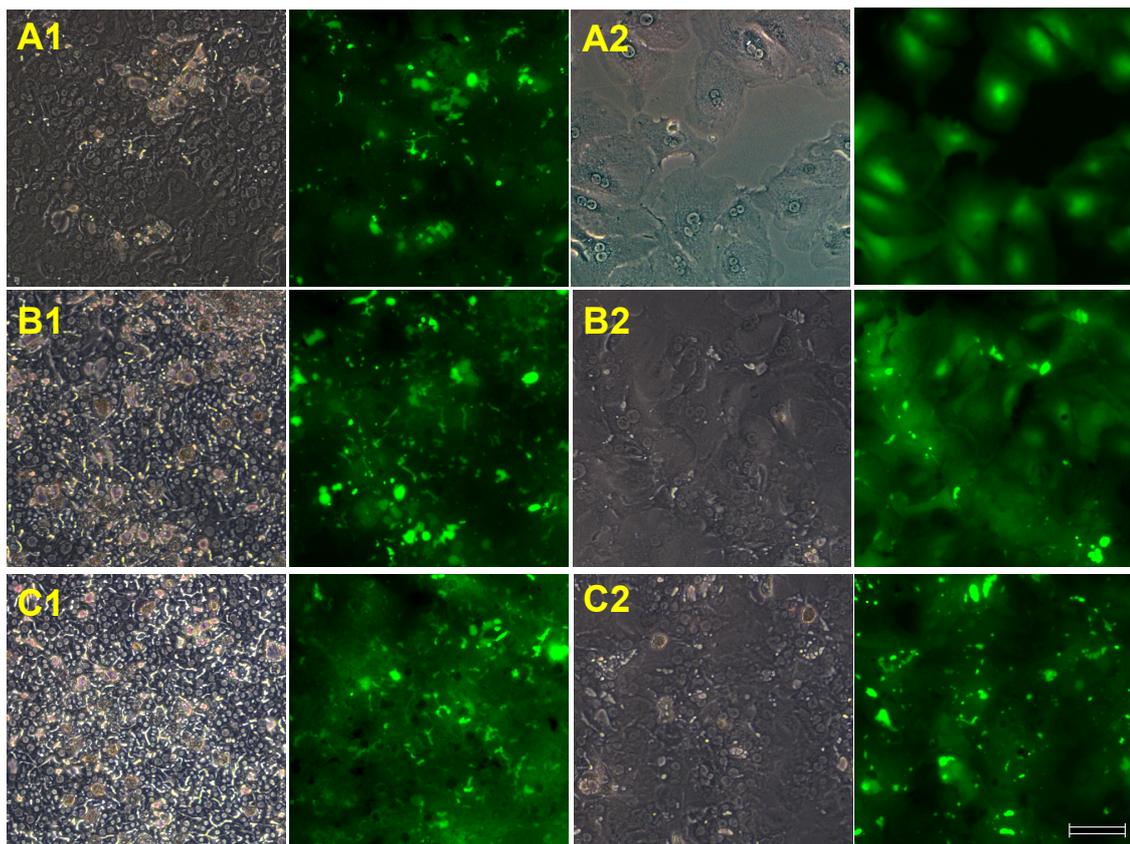


Abbildung 3.5: *FDA-Assay in Monolayerkulturen mit verschiedenen Zelldichten: 10.000 Zellen/cm² (A); 25.000 Zellen/cm² (B); 75.000 Zellen/cm² (C) Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen in der Mitte (A1, B1, C1) und am Rand (A2, B2, C2) des Wells; Messbalken 100 μ m*

⁹ Schulz I, Keller M, Heidebrecht F, nicht veröffentlichte Ergebnisse

Die Funktionalität der gebildeten Gallenkanälchen in Kulturen mit verschiedenen Zelldichten (10.000, 25.000 und 75.000 Zellen/cm²) wurde mittels Fluoresceindiacetat- (FDA-) Assay (siehe Kapitel 2.1.7) untersucht (siehe Abbildung 3.5). Dabei sollte das FDA von Hepatozyten aufgenommen, zu Fluorescein umgebaut und in die Gallenkanälchen transportiert werden. Auch Zellen, die keine Gallenkanälchen besitzen, können FDA aufnehmen (Abbildung 3.5 A2), allerdings reichert es sich dann im Zytoplasma an. Bei allen drei untersuchten Zelldichten ist die Anzahl an Gallenkanälchen in der Mitte des Wells am größten (Abbildung 3.5 A1, B1, C1).

* *

Da gezeigt werden konnte, dass unter diesen Bedingungen die Aktivität der Gallenkanälchen am höchsten ist, wurde 75.000 Zellen/cm² als beste Zelldichte für polarisierte Monolayerkulturen ausgewählt. Bei noch höheren Zelldichten nimmt der Anteil der toten Zellen nach der Aussaat deutlich zu. Für Studien des IL-6-Signalwegs in einer nichtpolarisierten Kultur wurden 10.000 Zellen/cm² eingesetzt.

3.1.3 Sandwichkultur

Auf einer Sandwichbeschichtung adhäreren die frisch isolierten Hepatozyten langsamer als auf Monolayer (siehe Abbildung 3.6 A). Auch die Gallenkanälchen werden in der Sandwichkultur langsamer gebildet (siehe die von den *Tight Junctions* abgegrenzten Bereiche in Abbildung 3.6 B). Schon eine Stunde nach der Aussaat sind in der Monolayerkultur kleine runde Gallengänge erkennbar, die sich nach einigen Stunden zu längeren Strukturen entwickeln, während in der Sandwichkultur auch nach vier Stunden nur Anzeichen von apikalen Bereichen zu beobachten sind.

Sandwichkulturen mit 100.000 Zellen/cm² bilden mehr Zell-Zell-Kontakte als mit 75.000 Zellen/cm², allerdings können bei dieser Zelldichte auch mehr tote oder apoptotische Zellen adhäreren, und die verfügbare Zellzahl einer Leber ist oft nicht ausreichend für die benötigte Anzahl an Wells. Die Zelldichte für die Sandwichkultur wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit der Monolayerkultur auf 75.000 Zellen/cm² festgelegt.

Die Konkavität der unteren Schicht ist stärker als bei der Monolayerkultur, weil das Volumen der Collagenlösung höher ist. Deshalb ist die Zelldichte in der Mitte eines Wells meistens höher als in einer Monolayerkultur. Da die Adhäsion der Zellen auf Sandwichbeschichtung schwächer ist, können die überflüssigen Zellen beim Waschen durch leichte Schüttelbewegungen entfernt werden. Die meisten Zellen in einer Sandwichkultur behalten für mindestens eine Woche ihre hexaedrische Form, eine morphologische Dedifferenzierung ist in der Regel in den Randbereichen stärker zu beobachten (siehe Abbildung 3.6 C).

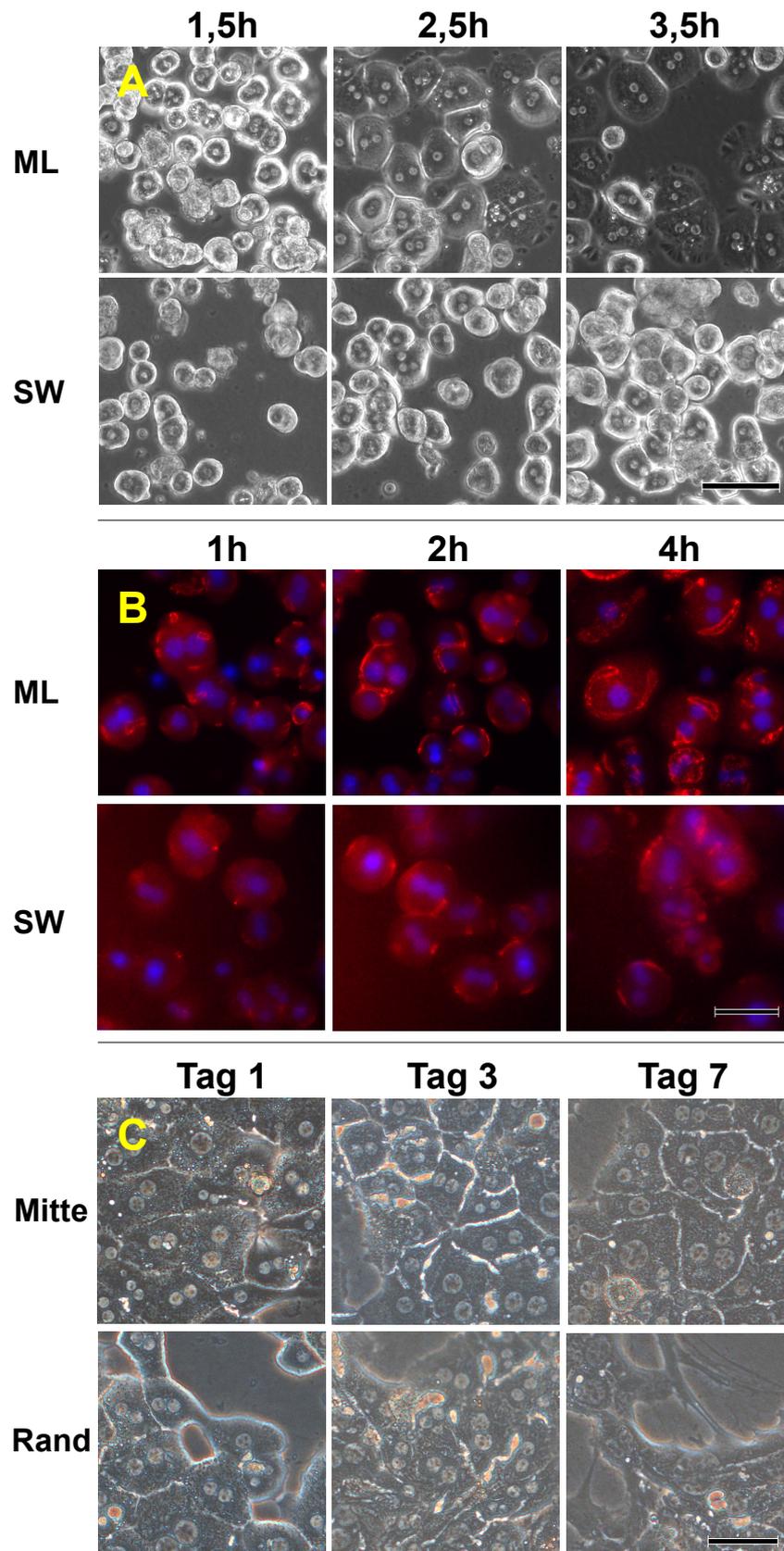


Abbildung 3.6: **Sandwichkultur.** Adhäsion der Zellen (A) und Bildung der Gallenkanälchen (B) in den ersten Stunden nach Aussaat im Vergleich zu einer Monolayerkultur; (C): Morphologische Unterschiede der Hepatozyten in der Mitte und im Randbereich eines Wells, Messbalken 100 μm (A), 50 μm (B) und (C)

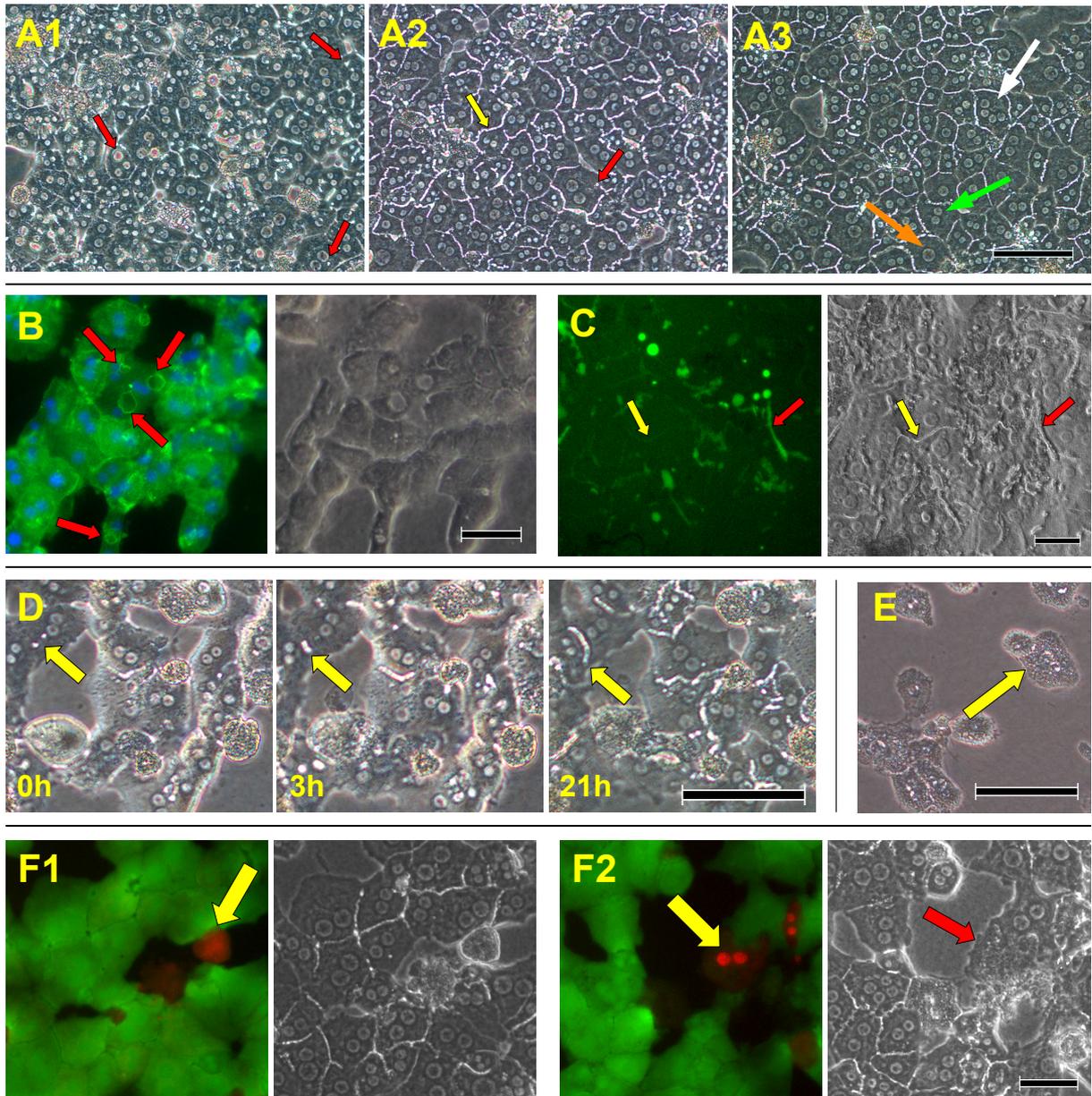


Abbildung 3.7: Sandwichkultur. (A): Gallenkanälchen in einer Sandwichkultur am Tag 1 (A1), Tag 2 (A2) und Tag 3 (A3), Messbalken 100 μm ; (B): Apikale Bereiche in Sandwichkultur am Tag 1, Immunfärbung gegen DPP IV (grün), DAPI (blau), Messbalken 50 μm (C): Aktivität der Gallenkanälchen am Tag 3 (FDA-Assay), Messbalken 50 μm ; (D): Entwicklung der Gallenkanälchen, Phasenkontrastbilder, Messbalken 100 μm ; (E): Apoptotische Zellen; (F): Live/Dead-Färbung am Tag 3, Messbalken 50 μm . Die Bedeutung der Pfeile ist im Text erklärt.

In den für diese Arbeit angesetzten Sandwichkulturen mit murinen Hepatozyten wurden am Tag 1 kleine runde helle Strukturen beobachtet, die teilweise eine zytoplasmatische Lokalisierung aufwiesen (Abbildung 3.7 A1, rote Pfeile). Am nächsten Tag waren die zytoplasmatischen Strukturen nur noch selten vorhanden (Abbildung 3.7 A2, roter Pfeil), und ausgestreckte Gallenkanälchen zwischen benachbarten Zellen waren zu erkennen (Abbildung

3.7 A2, gelber Pfeil). Am Tag 3 war die Bildung der Gallenkanälchen in der Regel abgeschlossen (Abbildung 3.7 A3). Um die Frage beantworten zu können, ob die zytoplasmatischen Strukturen am ersten Tag eine Vorstufe der Gallenkanälchen darstellen, wurde zunächst mittels einer Immunfärbung die Expression des apikalen Markers DPP IV untersucht. Dabei konnte eine positive Färbung und damit apikale Merkmale nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.7 B). Des Weiteren wurde die zeitliche Entwicklung der Zellen in Sandwichkultur fotografiert, um die Weiterentwicklung solcher Strukturen verfolgen zu können. Wie in Abbildung 3.7 D zu sehen ist (Pfeile), sammeln sich die zytoplasmatischen apikalen Bereiche an der Membran, fusionieren miteinander und bilden langgestreckte Gallenkanälchen. Obwohl die Gallenkanälchen schon am Tag 3 ein Netzwerk bilden, ist deren sekretorische Aktivität nicht gleichmäßig. Einige Kanälchen zeigen eine intensive FDA-Färbung (roter Pfeil in Abbildung 3.7 C), andere hingegen nur eine schwache Färbung (gelber Pfeil in Abbildung 3.7 C). Auch in der Sandwichkultur können verschiedene abgestorbene Zellen beobachtet werden: Zellen, die kurz nach der Isolierung sterben, bleiben wie in der Monolayerkultur abgerundet (siehe Abbildung 3.7 F1). Zellen, die während der Kulturzeit sterben (Abbildung 3.7 F2, gelber Pfeil), haben in der Regel weniger Zell-Zell-Kontakte und zeigen Ausstülpungen (Abbildung 3.7 E2, roter Pfeil). Bei geringer Zelldichte (Abbildung 3.19 E), wenn die Zellen kaum Kontakte zueinander bilden können, wird deutlich, dass Zell-Zell-Adhäsionen notwendig für das Überleben der Zellen sind.

Die Hepatozyten in einer Sandwichkultur sind mono- oder binuklear (gelber bzw. grüner Pfeil in Abbildung 3.7 A3) und die Polynuklearität bleibt konstant. Zellen mit mehr als zwei Kernen sind eine Ausnahme (weißer Pfeil in Abbildung 3.7 A3).

* *

Wie auch im Fall der Sandwichkultur für Rattenhepatozyten beschrieben, entspricht die Morphologie der Zellen sowie ihre Fähigkeit, Gallenkanälchen zu bilden in der etablierten Sandwichkultur für murine Hepatozyten besser der *in-vivo*-Situation als in einer Monolayerkultur. Jedoch sind verschiedene Untersuchungsmethoden, die für die Analyse von Signalwegen notwendig sind, allgemein in Sandwichkultur deutlich schwieriger durchzuführen. Daher wurde in einem nächsten Schritt versucht, neue Protokolle für Protein- und RNA-Extraktion sowie Immunfärbung in der Sandwichkultur zu entwickeln. Zusätzlich wurde ein semiquantitatives Western-Blot-Verfahren zum besseren Direktvergleich von Proteinprofilen in der Sandwich- und Monolayerkultur erweitert (siehe folgendes Kapitel). Mit den etablierten Protokollen wurden anschließend Aspekte der Interleukin-6-Signalweg in den Kulturen analysiert.

3.2 Etablierte Protokolle

3.2.1 Neuetablierung eines Protokolls zur Durchführung eines semiquantitativen Western-Blot¹⁰

Obwohl die am weitesten verbreitete Methode für quantitative Proteinanalysen der ELISA ist, hat der Western Blot einige Vorteile: Zum Einen wird durch die Trennung der Proteine nach Größe sichergestellt, dass nur spezifisch gebundenes Antikörper detektiert wird, zum Anderen lassen sich mehrere Proteine im gleichen Extrakt analysieren. Im Folgenden wurden die einzelnen Schritte des Western-Blot-Verfahrens analysiert und ein mathematisches Modell¹¹ für die Messkette abgeleitet. Basierend auf diesem Modell wurde eine Methode zur semiquantitativen Analyse von Western Blots entwickelt, die die gleichzeitige relative Quantifizierung verschiedener Proteine erlaubt.

Im Allgemeinen wird für absolute Quantifizierung von Western-Blot-Ergebnissen eine Verdünnungsreihe aus bekannten Konzentrationen eines rekombinanten Proteins als Eichreihe verwendet. Für relative Quantifizierung wird entweder ein Housekeeping-Protein [93], [94], [95] oder die aus der Membranfärbung ermittelte Gesamtmenge der transferierten Proteine [96] benutzt, um die Ergebnisse zu normieren. Wie bei anderen Verfahren, die auf Antikörper-Antigen-Reaktionen basieren (z.B. ELISA), kann auch beim Western Blot Sättigung auftreten, daher ist relative Quantifizierung ohne weiteres nur dann zuverlässig, wenn keine Sättigung auftritt. Daher ist eine Verdünnungsreihe (auch aus Gesamtprotein, siehe Seite 45) in jedem Fall hilfreich, um eine mögliche Sättigung zu detektieren. Die in dieser Arbeit etablierte Methode benutzt die Verdünnungsreihe, um die Ergebnisse zu linearisieren und auch bei einsetzender Sättigung noch korrekte relative Größen ermitteln zu können. Dafür wird aus der Verdünnungsreihe eine hyperbolische Kalibrierkurve ermittelt. Für die hyperbolische Regression wurde ein Programm¹² geschrieben, das die Koeffizienten der Kalibrierkurve bestimmt. Mithilfe dieses Programms können auch Eichreihen für andere Verfahren wie ELISA, BCA oder Bradford-Assays approximiert werden.

Messkette im Western Blot

Für eine quantitative Analyse von Western-Blot-Ergebnissen muss eine Korrelation zwischen den messbaren Ergebnissen und den Proteinmengen in den jeweils untersuchten Proben gefunden werden. Diese Korrelation wird durch die folgenden Arbeitsschritte bestimmt: Blotting, Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper, Chemilumineszenz-Reaktion,

¹⁰ Diese Ergebnisse sind in [73] veröffentlicht.

¹¹ Das mathematische Modell wurde in Zusammenarbeit mit Alexander Heidebrecht erstellt.

¹² Das Programm wurde von Alexander Heidebrecht geschrieben.

Bildaufnahme und -verarbeitung sowie Quantifizierung des Bildes (Densitometrie). Parameter, die die Korrelation beeinflussen, sind: Bedingungen des Blottransfers, Unregelmäßigkeiten im Blot [97], Konzentrationen der Antikörper und der ECL-Lösung, Belichtungszeit und Blende der Kamera, Farbformat, Definition der Banden sowie Art der Hintergrundkorrektur beim Quantifizieren.

Oberhalb einer bestimmten Proteinkonzentration wird die Eichreihe nichtlinear, weil Sättigung auftritt. Normalerweise wird der lineare Teil der Eichreihe durch eine Regressionsgerade angenähert und nur in diesem Bereich quantifiziert (siehe Mathrubutham M. and K. Vattem.: <http://www.piercenet.com/files/AN0012.pdf> und [98]). Um den nutzbaren Bereich der Eichreihe zu erweitern, muss zur Ermittlung der Kalibrierkurve eine nichtlineare Regression verwendet werden. Dazu muss zunächst ihr Kurventyp bestimmt werden. Dafür wiederum ist es erforderlich, die Prozesskette von der Proteinkonzentration in den Proben bis zur gemessenen Intensität der Banden im ECL-Bild zu betrachten. Dabei bleiben bei Schritten mit linearem Verhalten die Größenverhältnisse der Banden untereinander erhalten, während nichtlineare Effekte wie Sättigung diese Verhältnisse verändern können und Korrekturen am Endergebnis notwendig machen.

Für jede Probe wird eine bekannte Menge des Gesamtproteins in die Geltaschen pipettiert und per Elektrophorese nach Größe getrennt. Ein bestimmter Anteil davon wird danach beim Blotten auf die Membran transferiert. Idealerweise ist dieser Anteil für alle Proben gleich, allerdings ergeben sich Unterschiede aus dem inhomogenen elektrischen Widerstand des Gels über die Oberfläche, bedingt durch die lokale Proteinkonzentration, die Temperatur, und vermutlich auch durch andere Faktoren [97]. Dennoch wird hier die Transferfunktion als linear angenommen, da diese Faktoren größtenteils nicht systematisch sind. Die Qualität des Blottransfers und damit die Größe der entstandenen Fehler lässt sich durch quantitative Analyse der Membranfärbung abschätzen [73].

Nach dem Blotten wird die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Bindungskinetik wird von einigen Autoren als hyperbolisch angenommen [99], [100]. Tatsächlich wird die Reaktion zwischen Antikörper und Antigen durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben [101], [102], [103], das analog zur von Michaelis und Menten beschriebenen Kinetik von Enzymreaktionen [104] einen hyperbolischen Verlauf bewirkt. Gleichung (1) zeigt die entsprechende Hyperbelformel:

$$C_{AKI} = hyp(C_{prot}) = C_{AKI, max} - \frac{a}{C_{prot} - C_{prot,0}} \quad (1)$$

Der sekundäre Antikörper bindet auf die gleiche Weise, also auch mit hyperbolischem Verhalten, an den primären Antikörper. Durch mathematische Umformungen kann gezeigt werden, dass die hyperbolische Funktion einer anderen hyperbolischen Funktion wiederum eine Hyperbel ist, mit entsprechend veränderten Koeffizienten (siehe ergänzende Informationen zu [73]). Die kombinierte Transferfunktion der beiden Antikörper ist also weiterhin hyperbolisch:

$$C_{AK2} = hyp(C_{prot}) \quad (2)$$

Die ECL-Reaktion ist eine klassische Enzym-Substrat-Reaktion, bei der das Substrat in großen Mengen vorhanden und das Enzym an den sekundären Antikörper gebunden ist. Die lokale Emissionsrate von Licht (oder Intensität, I) hängt also von der lokalen Enzymkonzentration C_{Enz} (welche proportional zu C_{AK2} ist) und der Reaktionsrate des Enzyms ab:

$$I = C_{Enz} \cdot V_{ECL} \quad (3)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit V_{ECL} wird nach der Michaelis-Menten-Formel bestimmt, wobei als Voraussetzung die Substratkonzentration viel höher als die des Enzyms sein muss:

$$V_{ECL} = \frac{V_{max} \cdot C_{Subst}}{K_m + C_{Subst}} \quad (4)$$

wobei V_{max} und K_m für eine bestimmte Enzym-Substrat-Paarung Konstanten sind und C_{Subst} die Konzentration des Substrats ist. Man beachte, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht von der Enzymkonzentration abhängig ist sondern nur vom Substrat. Ist C_{subst} konstant, ist auch die Reaktionsgeschwindigkeit über die gesamte Membran konstant. Dies ist nicht unbedingt gegeben, wenn die Membran nur mit ECL-Lösung benetzt wird, da an Stellen mit erhöhter Enzymkonzentration (also mit viel spezifischem Protein) das Substrat schneller verbraucht wird als an anderen Stellen. Daher wurde die Membran für zu quantifizierende Aufnahmen komplett in ECL-Lösung getaucht, sodass innerhalb der Flüssigkeit ein Austausch zwischen den Stellen mit hohem und niedrigem Substratverbrauch stattfindet. Damit ist die Reaktionsgeschwindigkeit über die Membran konstant und die lokale Emissionsrate proportional zur Konzentration des sekundären Antikörpers (Gleichung (3) bei konstantem V_{ECL}).

Wie die meisten Chemilumineszenz-Systeme hat das für diese Arbeit verwendete einen kalibrierten Sensor und liefert Pixelwerte, die zu der lokalen Leuchtdichte I auf der Membran proportional sind, solange keine Überbelichtung stattfindet. Bei der Quantifizierung in *ImageJ* werden die Pixelwerte je über eine Bande integriert, um einen Wert für die Gesamthelligkeit zu erhalten (IDV: *Integrated Density Value*), der wiederum proportional zur

Lichtmenge ist, die von der gesamten Bande emittiert wird.

Insgesamt besteht die Signalkette also aus mehreren linearen und hyperbolischen Schritten. Damit ist das Endergebnis proportional zu einer hyperbolischen Funktion der Proteinmengen in den Geltaschen zu Beginn des Prozesses.

Über das relevante Intervall mag diese Funktion im speziellen Fall zwar linear sein, wird allerdings eine Verdünnungsreihe benutzt, um die Linearität zu kontrollieren, so kann nach Bestimmung der Parameter der hyperbolischen Transferfunktion eine relative Quantifizierung auch außerhalb des linearen Bereichs stattfinden.

Kalibrierkurve

Die Verdünnungsreihe für die Kalibrierkurve wurde jeweils aus einer Proteinlösung hergestellt, die alle Proteine in ausreichender Menge enthielt, die jeweils von Interesse waren. Dafür erwiesen sich Proben als geeignet, die aus der gleichen oder einer ähnlichen Kultur wie der zu untersuchenden stammen. Die Verdünnungsreihe sollte einen Bereich abdecken, der die Proteinkonzentrationen in den Proben einschließt. Extrapolation über den Bereich der Verdünnungsreihe hinaus ist zwar möglich, reduziert aber die Zuverlässigkeit der Ergebnisse mit steigender Extrapolationsweite. Im Zweifelsfall kann die größte und geringste benötigte Verdünnung über einen Vorversuch mit sehr umfangreicher Verdünnungsreihe bestimmt werden, die dann bei späteren Blots auf den zu erwartenden Umfang reduziert wird.

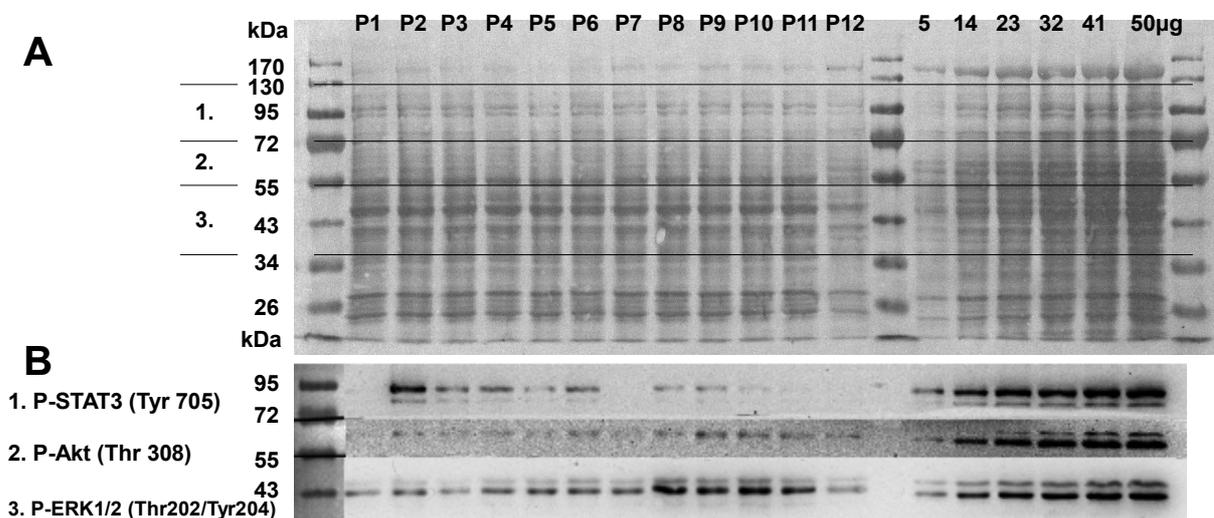


Abbildung 3.9: Analyse mehrerer Proteine mit einer Kalibrierkurve. A: Membranfärbung mit Ponceau S. Links 12 unterschiedliche Proben und rechts 6 Verdünnungen einer Probe für die Kalibrierkurve. Die horizontalen Linien zeigen, an welchen Stellen die Membran geschnitten wurde; B: ECL-Bilder der einzelnen Membranstreifen mit den verschiedenen Proteinen.

Da die verwendete Hyperbelfunktion drei Freiheitsgrade hat, kann eine Hyperbel mit perfekter Übereinstimmung durch jeden beliebigen Satz von drei Punkten geführt werden.

Dann geht aber jeder Messfehler direkt in die Koeffizienten der Kurve ein. Daher ist für sinnvolle Ergebnisse eine Verdünnungsreihe aus mindestens 4 Proben notwendig. Ähnlich wie bei der Mittelwertbildung wird durch Verwendung zusätzlicher Punkte die statistische Signifikanz erhöht. In dieser Arbeit wurden jeweils Verdünnungsreihen aus 6 Proben verwendet.

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen ist, kann eine einzelne Verdünnungsreihe für die Quantifizierung mehrerer verschiedener Proteine auf der gleichen Membran verwendet werden. Dazu wird anhand der Marker abgeschätzt, wo auf der Membran sich die jeweils gesuchten Proteine befinden, und die Membran entsprechend in Streifen geschnitten. Diese Streifen können dann unabhängig voneinander mit verschiedenen Antikörpern behandelt werden.

Datenverarbeitung

Abbildung 3.10 illustriert die Gewinnung der quantitativen Daten am Beispiel von P-ERK1/2(Thr202/Tyr204). Zunächst werden alle Banden (Proben und Eichreihe) im jeweiligen ECL-Bild (Abbildung 3.10 A) mit *ImageJ* quantifiziert, d.h. die Lichtmenge (IDV) für jede Bande wird bestimmt. Da für die Verdünnungsreihe die Gesamtproteinmengen bekannt sind, können die Messpunkte für die Kalibrierkurve gebildet werden, indem jedem gemessenen IDV aus der Verdünnungsreihe (Abbildung 3.10 B, y-Achse) die eingesetzte Gesamtproteinmenge zugeordnet wird (Abbildung 3.10 B, x-Achse). Diese ist proportional zur jeweiligen Menge an P-ERK1/2, da innerhalb der Verdünnungsreihe der Anteil des spezifischen Proteins an der Gesamtproteinmenge konstant ist. Durch diese Punkte wird dann die hyperbolische Regression ausgeführt. Über die dabei entstehende hyperbolische Funktion kann jeder Proteinmenge ein IDV zugeordnet werden. Invertiert man die Funktion der Kalibrierkurve (Abbildung 3.10 C), so ordnet sie umgekehrt jedem IDV eine Proteinmenge zu. Diese Beziehung kann nun verwendet werden, um den IDV einer Probe mit unbekannter Menge an spezifischem Protein zu interpretieren. Die resultierenden Zahlen sind zwar keine absoluten Proteinmengen (zu deren Berechnung müsste die Zusammensetzung der Verdünnungsreihe genau bekannt sein), sind aber immer proportional zur Menge an P-ERK1/2 in der quantifizierten Probe. Sie können also benutzt werden, um die Verhältnisse der Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben untereinander zu bestimmen.

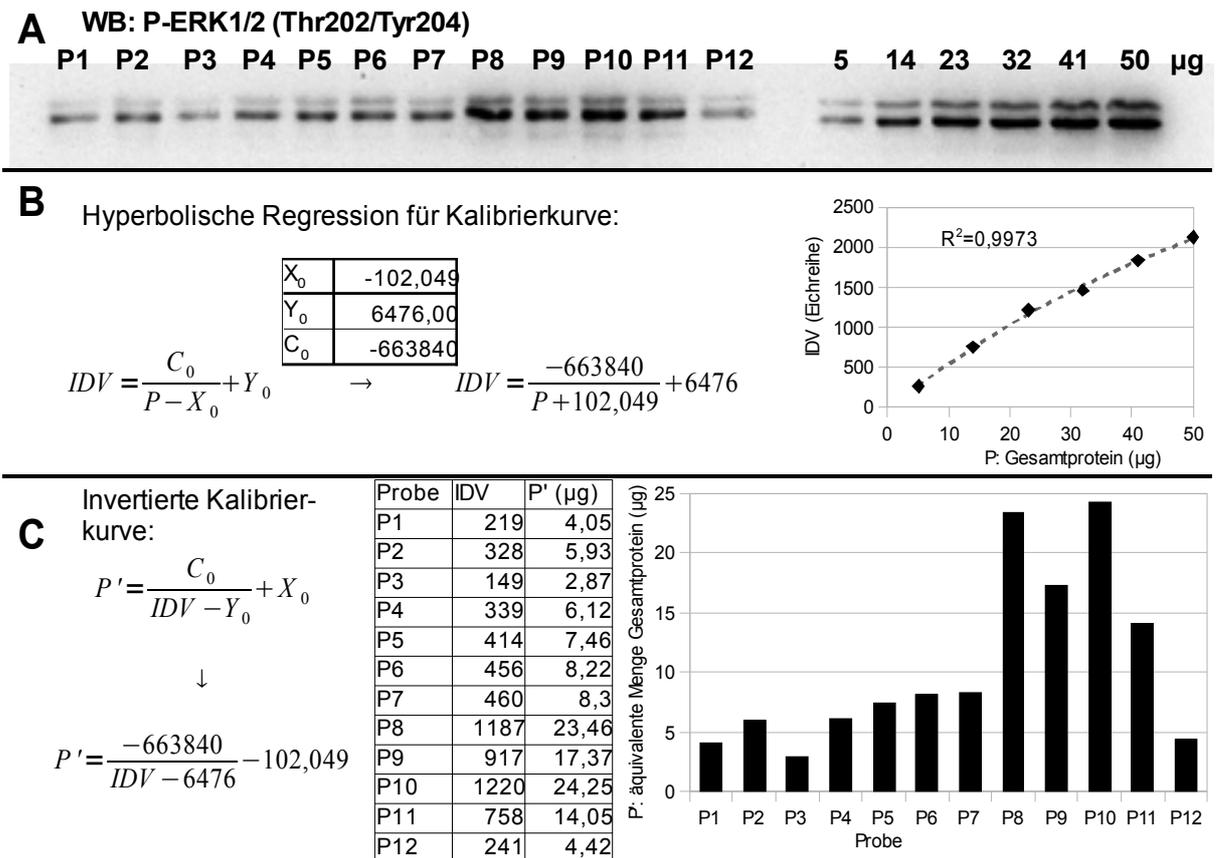


Abbildung 3.10: Schema der Datenverarbeitung. A: ECL-Bild mit 12 Proben und einer 6-stufigen Verdünnungsreihe; B: Die Menge an Proteinlösung in der Verdünnungsreihe wird dem Ergebnis der Quantifizierung (ein IDV je Bande) zugeordnet und per Regression geeignete Koeffizienten für die hyperbolische Kalibrierkurve gefunden; C: Nach Invertieren der Kalibrierkurve können den übrigen Proben anhand ihrer IDV-Werte jeweils entsprechende relative Proteinmengen zugeordnet werden, die proportional zur Menge an spezifischem Protein in den Ausgangsproben sind.

3.2.2 Neu etablierte experimentelle Protokolle in Sandwichkultur

Die Sandwichkultur, eine polarisierte Langzeitkultur für primäre Hepatozyten, wird weitgehend als *in vitro*-Modell für die Analyse des Stoffwechsels unter Einwirkung verschiedener Pharmaka verwendet. Trotz der vielen Vorteile, die diese Kultur bietet (siehe auch Kapitel 1.2.2) wurden bisher kaum Untersuchungen der Gen- und Proteinexpression in der Sandwichkultur veröffentlicht. Ein Grund dafür könnte sein, dass RNA- und Proteinextraktion durch die Collagenschicht und die hohen Albuminmengen, die Hepatozyten in Sandwichkultur erzeugen, erschwert werden: Bei Verwendung eines konventionellen Protokolls zur Proteinextraktion werden große Mengen Albumin mitisoliert, und für die Analyse anderer Proteine als Albumin ist eine Immunpräzipitation notwendig [105]. Für

RNA-Extraktion nach derzeit verfügbaren Protokollen muss entweder ein Verdau der Collagenschichten mit Collagenase [106] oder die aufwendigere Prozedur für RNA-Isolierung aus Gewebeproben [107] durchgeführt werden. Die Extraktion der Proteine oder RNA nach einem Collagenase-Verdau ist zwar ein einfaches Verfahren, führt aber zu Veränderungen in der Expression von Genen und Proteinen [108].

Auch Immunfärbungen sind nur bedingt möglich, da die Collagenschicht eine Diffusionsbarriere darstellt.

Immunfärbung¹³

Durch die Kultivierung der Zellen zwischen zwei Collagenschichten entsteht ein Massentransferproblem [109], d. h. Moleküle können, je nach Größe und Porengröße der Collagematrix, die Schicht durchdringen oder nicht. Die Antikörper für die Immunfärbung sind mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa relativ große Moleküle.

* *

Die Immunfärbung einer Standard-Sandwichkultur (mit 1 mg/ml Collagen für die obere Schicht [4]) zeigt dementsprechend eine sehr starke Hintergrundfärbung (nicht dargestellt), weil ein großer Teil der Antikörper nicht in die Zellen gelangt, sondern in der Collagenschicht zurückbleibt. Um die Porengröße zu erhöhen, wurden zunächst geringere Collagenkonzentrationen für die obere Schicht getestet. Immunfärbungen am Tag 1 (einige Stunden nach der Polymerisierung der zweiten Schicht) zeigten, dass nicht alle Antikörper bei der gleichen Collagenkonzentration eine spezifische Färbung aufweisen: Zum Beispiel funktionierte die β -Catenin-Färbung erst bei 0,5 mg/ml gut, die DPP-IV-Färbung aber schon bei 0,7 mg/ml (siehe Abbildung 3.11 A1 und A2). Um eine Konzentration zu ermitteln, bei der möglichst viele Antikörper anwendbar sind, wurde die minimale Konzentration bestimmt, bei der die Schicht noch polymerisiert. Für Kulturen in 6-Well-Platten ist das Ergebnis 0,4 mg/ml, in 24-Well-Platten 0,3 mg/ml.

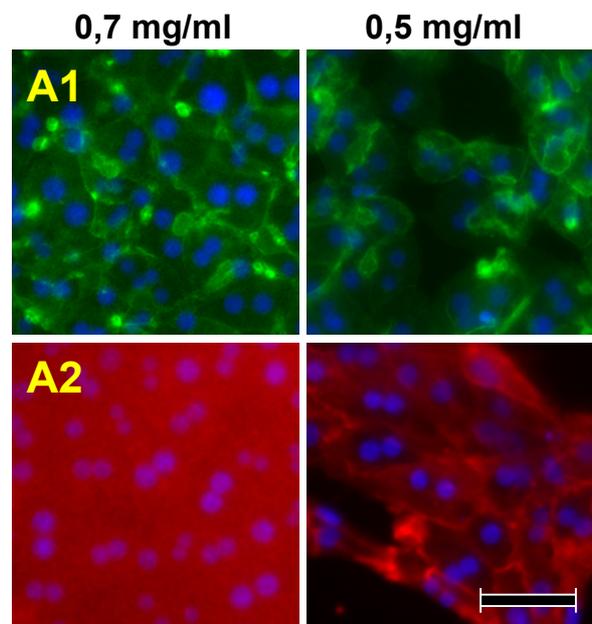


Abbildung 3.11: **Immunfärbung in der Sandwichkultur.** Kultur mit oberer Schicht von 0,7 (links) bzw. 0,5 (rechts) mg/ml Collagen; (A1): DPP IV; (A2): β -Catenin; DAPI (blau); Messbalken 100 μ m

¹³ Dieses Protokoll wurde in Zusammenarbeit mit Isabell Schulz und Mario Keller etabliert.

Die modifizierte Sandwichkultur mit einer oberen Schicht aus 0,4 mg/ml Collagen in 6-Well-Platten bzw. 0,3 mg/ml Collagen in 24-Well-Platten eignet sich besser für eine Immunfärbung, allerdings wurde bei Betrachtung über längere Zeiten beobachtet, dass die Qualität der Immunfärbung während der ersten drei Tage der Kulturzeit abnimmt, später aber wieder besser wird¹⁴.

Bei dem Versuch, STAT3 in der Sandwichkultur mittels Immunfärbung nachzuweisen, konnte nach der Stimulation mit IL-6 keine Kernfärbung beobachtet werden (siehe Abbildung 3.12 A1 und A2). Daher wurde getestet, ob es sich um ein Problem der Immunfärbung handelt oder ob in Sandwichkultur kein Kerntransport von P-STAT3 stattfindet: Dazu wurde zunächst das Histonprotein H2A.Z gefärbt und dabei ebenfalls keine Kernfärbung beobachtet (siehe Abbildung 3.12 B). Des Weiteren wurde durch Western Blot von P-STAT3 in Kern- und Zytoplasma-Extrakten eindeutig gezeigt, dass STAT3 phosphoryliert wird und sich nach der Stimulation im Kern befindet (Abbildung 3.12 C).

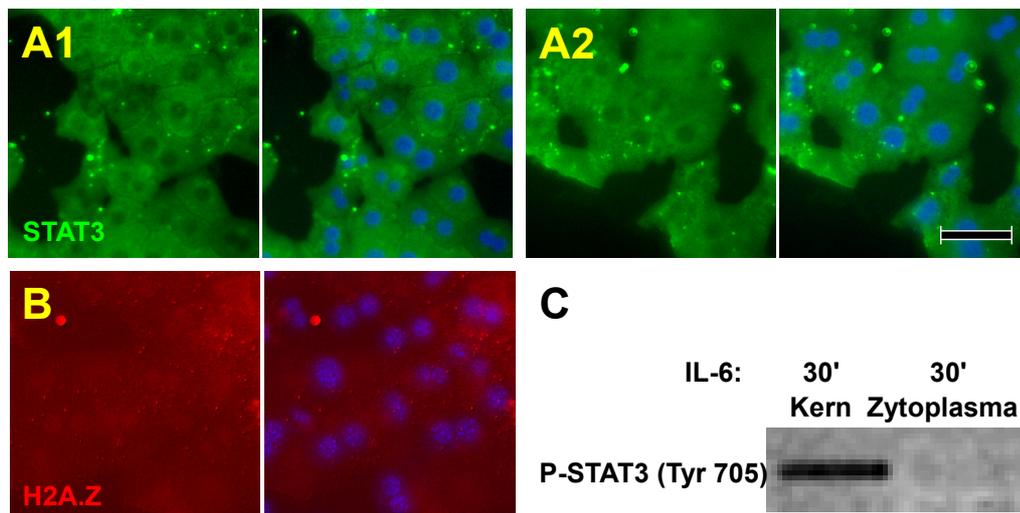


Abbildung 3.12: **Immunfärbung von kernlokalisierten Proteinen in Sandwichkultur.** STAT3 in Kontrollzellen (A1); STAT3 in stimulierten Zellen (20 ng/ml IL-6, 30') (A2); H2A.Z; (B); Western Blot in Kern- und Zytoplasmaextrakte (C). DAPI blau. Messbalken 50 μ m

* *

Der Grund für die Variation der Färbungsqualität ist vermutlich die Veränderung der Schichtzusammensetzung, die aufgrund der Remodellierung der EZM durch die Hepatozyten geschieht (siehe auch Kapitel 3.6). In 6-Well-Platten konnte die Färbung verbessert werden, indem das Sandwichkonstrukt nach der Fixierung zusammen mit der Membran in kleinere Stücke geschnitten wurde (siehe auch Kapitel 2.3.7). Damit war zu erwarten, dass die Antikörper dann von allen Seiten Zugang zu den Zellen haben. Mit dieser Methode sind auch

¹⁴ Schulz I, Keller M, Heidebrecht F, nicht veröffentlichte Ergebnisse

am Tag 3 qualitativ gute Färbungen möglich.

Eine Erklärung für die problematische Immunfärbung der Kernproteine in der Sandwichkultur könnte sein, dass die Collagenschicht die PFA-Fixierung behindert. Bei unzureichender Fixierung könnten die Proteine innerhalb der Zelle beweglich bleiben, während an die Zellmembran gebundene Proteine (etwa die ausgewählten Polaritätsmarker) ihre Lokalisierung besser behalten.

Proteinextraktion¹⁵

Die aktuell verfügbaren Protokolle für Proteinextraktion aus Sandwichkultur sind entweder sehr aufwendig oder benutzen enzymatische Verfahren, die die Proteinexpression verändern können.

Sowohl das Kulturmedium als auch die Proteinextrakte von Hepatozyten in Sandwichkultur enthalten hohe Albuminmengen [105], [4], [110]. Das ist nicht ungewöhnlich, da Albumin das Hauptprotein im Plasma ist und von Hepatozyten synthetisiert und ins Blut abgegeben wird.

* *

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Großteil des Albumins in den Proteinextrakten ein Artefakt des Extraktionsprotokolls ist: Die Collagenschicht enthält ein bestimmtes Volumen Kulturmedium (im Folgenden als Restmedium bezeichnet), das vor der Extraktion nicht durch Absaugen entfernt werden kann (siehe schematische Darstellung in Abbildung 3.13 A). Die Albuminkonzentration im Restmedium kann sogar etwas höher sein als im Kulturmedium, weil je nach Konzentration die Collagenschicht eine Diffusionsbarriere für größere Moleküle darstellt [111]. Da bei der Standard-Extraktion nur das Kulturmedium abgesaugt und die Collagenschicht mit dem Restmedium zusammen mit den Zellen homogenisiert wird, befindet sich hinterher auch das Albumin aus der Collagenschicht im Proteinlysate.

Western-Blot- und ELISA-Analysen (Abbildung 3.13 B1 bzw. B2) zeigen, dass die Albuminkonzentration im Restmedium (RM) der untersuchten Sandwichkulturen tatsächlich etwas höher ist als im Kulturmedium (KM) (bei 1 mg/ml Collagen in der unteren und 0,4 mg/ml in der oberer Collagenschicht).

¹⁵ Diese Ergebnisse wurden in [108] veröffentlicht

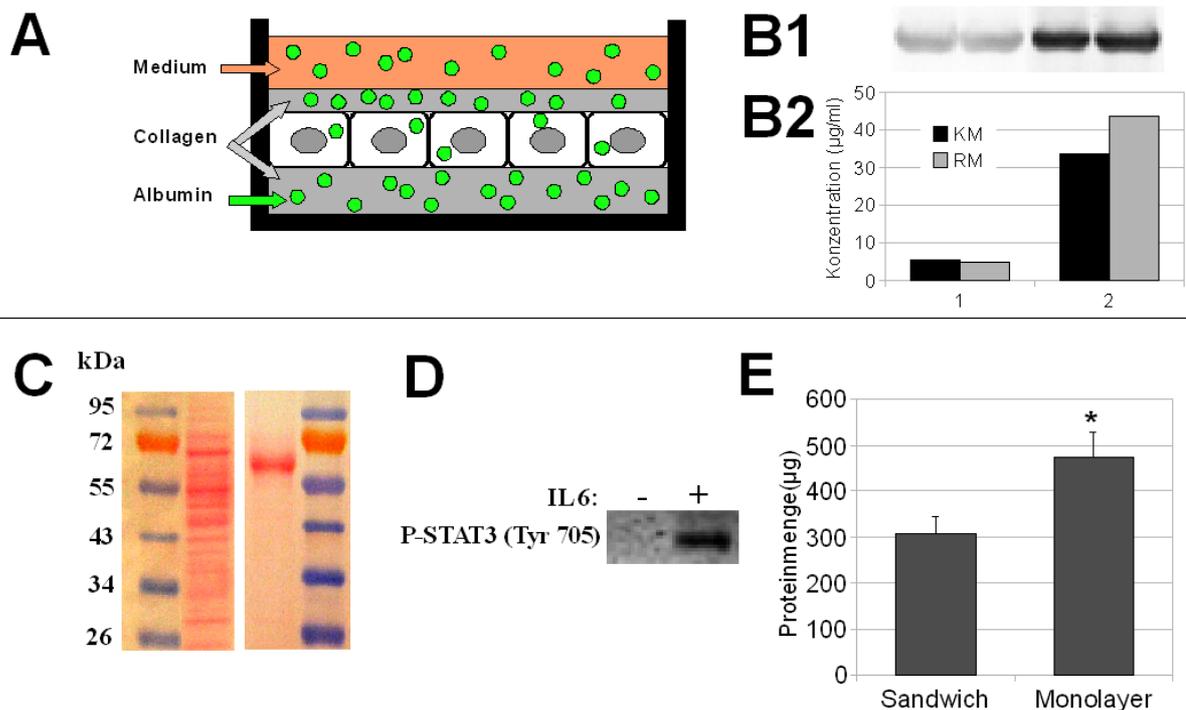


Abbildung 3.13: Proteinextraktion. (A): Schematische Darstellung der Sandwichkultur; (B): Albuminnachweis im Kulturmedium (KM) und Restmedium (RM) zweier Wells mittels Western Blot (B1) und ELISA (B2); (C): Ponceau-S-Färbung der Blotmembran für Gesamtproteinextrakte, die mit dem etablierten Protokoll (links) und nach direkter Lyse des Collagenkonstrukts (rechts) gewonnen wurden; (D): P-STAT3 (Tyr 705) in der Sandwichkultur; (E): Gesamtproteinmengen von Sandwich- und Monolayerproben, Mittelwerte von jeweils 10 Proben, * $P < 0.001$.

Um die Co-Isolierung von Proteinen aus dem Restmedium zu verhindern, wurde das Extraktionsprotokoll folgendermaßen geändert: Nachdem die Zellen im Well mit kaltem PBS gewaschen wurden, wird das gesamte Sandwich mithilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 2-ml-Eppendorf-Gefäße transferiert. Nach einer sanften Zentrifugation, die die Zellen intakt lassen sollte (1 min, 7500 U/min¹⁶, 4°C), werden das Restmedium (Überstand) und das Collagen soweit wie möglich entfernt, das Zellpellet in Lysepuffer homogenisiert und die Lyse normal weiter durchgeführt.

Die Albuminkonzentration in den nach diesem Protokoll aufgereinigten Proteinextrakten ist geringer, sodass nach Auftragen von 20 µg Gesamtprotein in SDS-PAGE schon in der Ponceau-S-Färbung der Membran auch andere Proteine als Albumin sichtbar sind (Abbildung 3.13 C rechts), im Gegensatz zu den nach Standardprotokoll gewonnenen Lysaten (Abbildung

¹⁶ Die Drehzahlangaben in U/min beziehen sich auf eine Tischzentrifuge mit einem Rotor von 8,5 cm Radius.

3.13 C links). Auch relativ schwach exprimierte Proteine wie phosphoryliertes STAT-3 können so in den Sandwichextrakten nachgewiesen werden (Abbildung 3.13 E).

Des Weiteren wurden die extrahierten Mengen an Gesamtprotein pro Well aus jeweils zehn Monolayer- bzw. Sandwichkulturen verglichen. Dabei ließ sich feststellen, dass die aus den Sandwichkulturen extrahierten Proteinmengen signifikant geringer als bei Monolayerkulturen sind ($308.02 \pm 11.54 \mu\text{g}$ vs. $473.79 \pm 17.08 \mu\text{g}$, $P < 0.001$, Abbildung 3.13 E). Das könnte daran liegen, dass die Zellen nach der sanften Zentrifugation nicht vollständig pelletiert sind und teilweise mit dem Restmedium entfernt werden.

* *

Trotz der geringeren Ausbeute sind $300 \mu\text{g}$ Protein pro Well für zahlreiche Analysen ausreichend, und bei Verwendung entsprechend geringerer Volumina von Lysepuffer kann eine ähnliche Konzentration der Lysate wie bei Monolayerextrakten erreicht werden.

Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die Albuminmenge im Kulturmedium nur einen Teil des von den Zellen sekretierten Albumins darstellt, da auch das Restmedium in der Collagenschicht eine hohe Albuminkonzentration aufweist. Daher ist für die korrekte Bestimmung der Albuminmenge mittels ELISA die Analyse beider Mediumfraktionen notwendig.

RNA-Extraktion¹⁷

Auch für die RNA-Extraktion aus Sandwichkultur sind die aktuell verfügbaren Protokolle entweder zeitaufwendig, oder verwenden enzymatische Reaktionen, die die Genexpression der Zellen beeinflussen können [106], [107]. Daher wurde eine neue Methode entwickelt.

* *

Der Versuch, RNA aus Sandwichkultur durch Lyse des gesamten Konstrukts zu isolieren und die RNA über eine Säule (RNeasy-Kit, Qiagen) zu extrahieren, führte zu keinen Ergebnissen. Das kann zum einen daran liegen, dass das Collagen die Säule verstopft, zum anderen daran, dass die Präsenz von Medium die Bindung von RNA an die Säule erschwert.

Um die Menge an Collagen im Extrakt zu reduzieren, wurden für die RNA-Isolierung aus Sandwichkulturen zunächst, wie bereits bei der Proteinextraktion beschrieben, durch Zentrifugation Zellpellets gewonnen. Anschließend wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen aus den Pellets isoliert und ihre Reinheit bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2). Das Verhältnis $A_{260/230}$ sollte über 1,8 liegen, ist aber in einigen Fällen direkt nach der Säulenaufreinigung noch zu gering (siehe Abbildung 3.14 A), die Reinheit der RNA kann aber durch eine einfache Ethanol-fällung ohne signifikanten Verlust an RNA verbessert

¹⁷ Diese Ergebnisse wurden in [108] veröffentlicht

werden (Vergleiche Abbildung 3.14 vor und nach der Fällung).

A

Probe	vor der Fällung				nach der Fällung			
	Konzentration (ng/µl)	Menge (µg)	A _{260/280}	A _{260/230}	Konzentration (ng/µl)	Menge (µg)	A _{260/280}	A _{260/230}
1	476,89	19,08	2,11	2,15	422,54	16,9	2,02	2,3
2	444,2	17,77	2,11	2,14	406,36	16,25	2,03	2,28
3	377,61	15,1	2,11	1,78	317,53	12,7	2,01	2,34
4	302,07	12,08	2,15	0,81	287,66	11,51	1,99	2,34
5	300,53	12,02	2,12	0,79	273,57	10,94	1,98	2,34
6	313,59	12,54	2,12	2,1	279,31	11,17	1,97	2,33
7	300,53	12,02	2,12	0,79	263,14	10,53	2,04	2,29
8	391,88	15,68	2,1	2,01	348,34	13,93	2,01	2,3
9	305,53	11,92	2,1	1,93	267,81	10,44	1,97	2,31
10	304,28	11,87	2,13	0,87	278,91	10,88	1,96	2,32
11	324,93	12,67	2,1	2,05	305,14	11,90	1,98	2,3
12	243,32	9,49	2,1	1,86	237,07	9,25	1,96	2,31

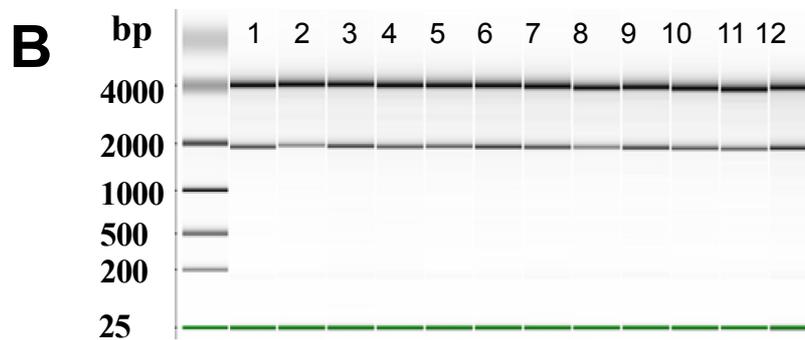
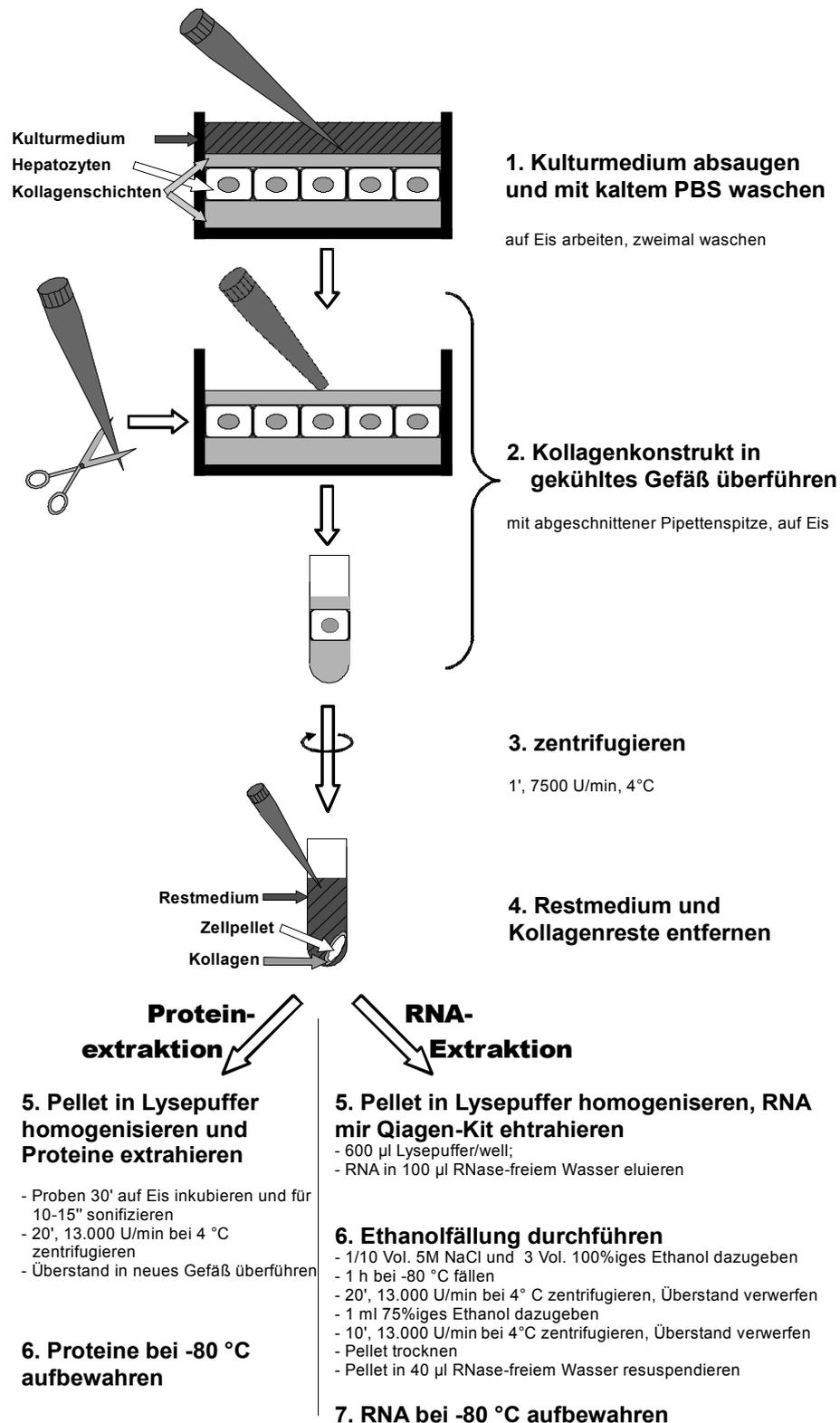


Abbildung 3.14: RNA-Extraktion. (A): Konzentration, Menge und Reinheit der RNA von 12 Proben vor und nach der Ethanol-fällung. $A_{260/230}$ -Verhältnisse unter 1,8 sind hervorgehoben; (B): Darstellung der Densitometrie-Ergebnisse zur Bewertung der Qualität.

Die Qualität der RNA wurde von *Miltenyi Biotec* mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) ermittelt und in einem Gelbild-ähnlichen Graphen dargestellt (Abbildung 3.14 B). Dieser sollte idealerweise nichts anderes als zwei klar definierte Banden für 18S und 28S rRNA zeigen. Als quantitatives Maß für die RNA-Qualität wurde die RIN-Nummer (RNA Integrity Number) mit einem Algorithmus ausgerechnet, der unter anderem auch die Intensitäten der 28S und 18S rRNA-Banden berücksichtigt. Eine RIN von 10 zeigt perfekte RNA-Qualität an, während ein Wert von 1 auf sehr niedrige Qualität hinweist [112]. Die für die analysierten Proben ermittelten RIN-Werte liegen zwischen 9,5 und 10, was bedeutet, dass das verwendete Protokoll RNA-Extrakte von sehr hoher Qualität erzeugt.

Abbildung 3.15 zeigt eine Übersicht der entwickelten Protokolle sowie praktische Hinweise zur Durchführung.



Hinweise

- RNA-Extraktion:** - die Extraktion sollte so schnell wie möglich erfolgen
- Schritt 2:** - für die RNA-Extraktion sollten RNase-freie Spitzen verwendet werden
- Schritt 4:** - das Pellet wird nicht vollständig fest, also ist Vorsicht geboten.
- Kollagenfasern können die Pipettenspitze verstopfen. Eine leicht abgeschnittene Spitze ist besser geeignet
- Es ist nicht möglich, das Restmedium 100%ig zu entfernen. Schritte 3 und 4 zu wiederholen, verbessert das Ergebnis.

Abbildung 3.15: Ablaufdiagramm für die etablierten Extraktionsprotokolle

Des Weiteren wurde ein Vergleich der neu etablierten Protokolle für RNA- und Proteinextraktion mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren, die auf einem enzymatischen Verdau der Collagenschichten basieren, durchgeführt¹⁸. Dazu wurden jeweils Protein und RNA aus einer Sandwichkultur am Tag 3 extrahiert. Für die Proteinextraktion wurde eine Stimulation mit IL-6 für 10 und 30 Minuten durchgeführt. Proteine aus je drei Wells und einem Kontrollwell wurden nach den zwei Methoden extrahiert und die Phosphorylierung von STAT3 mittels Western Blot untersucht (Abbildung 3.16 A1) und semiquantitativ ausgewertet (Abbildung 3.16 A2). RNA wurde aus je zwei Wells extrahiert, und die Expression von c-Fos wurde mittels PCR analysiert. C-Fos wird nach der Isolierung von Hepatozyten aus Leber durch den Collagenaseverdau hochreguliert (siehe auch Kapitel 3.6), deswegen wurde für die PCRs als Vergleich auch RNA aus frisch isolierten Hepatozyten verwendet (Abbildung 3.16 B).

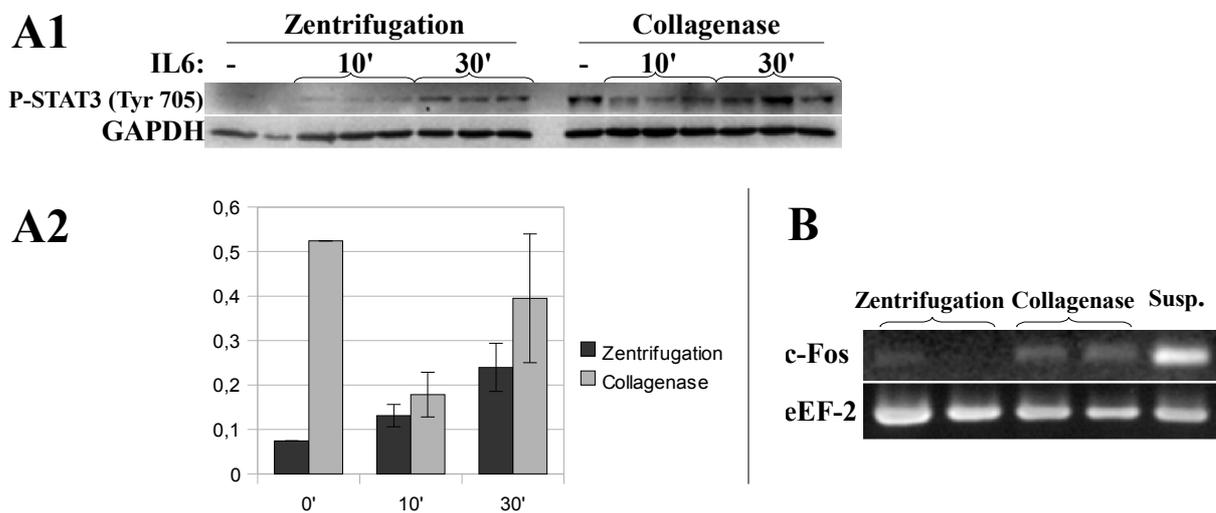


Abbildung 3.16: Vergleich der etablierten Methoden („Zentrifugation“) mit einer Extraktion nach Collagenaseverdau („Collagenase“). (A): Western Blot (A1) mit quantitativer Auswertung, $n=3$ (A2); (B): PCR. Susp = Hepatozyten in Suspension direkt nach der Isolierung.

* *

Der Vergleich zeigt eindeutig, dass sogar die Behandlung mit Collagenase alleine die Phosphorylierung von STAT3 hervorruft (siehe Abbildung 3.16 A1 und A2, Kontrollzellen). Auch nach der Stimulation mit IL-6 konnten in Proteinextrakte gewonnen durch Kollagenaseverdau höhere Mengen an P-STAT3 nachgewiesen werden. Die Expression von c-Fos in RNA-Proben ist ebenso nach einem Collagenaseverdau etwas höher, allerdings nicht so hoch wie in frisch isolierten Zellen. Damit ist gezeigt, dass die Entfernung der Collagenschichten durch enzymatischen Verdau eine Veränderung der Expression sowohl auf

¹⁸ Experimente in Zusammenarbeit mit Isabell Schulz, siehe auch [108]

Gen- als auch auf Proteinebene bewirkt. Der Vorteil gegenüber nichtenzymatischen Methoden ist, dass die neu etablierten Protokolle weniger zeitaufwendig sind, da sie in einem einfachen Schritt das Collagen und das darin enthaltene Medium vor der Lyse entfernen. Dadurch ist für die Proteinextraktion keine Immunpräzipitation mehr nötig, da das sekretierte Albumin zusammen mit dem Restmedium vor der Lyse entfernt wird, und eine sehr gute Qualität der RNA wird auch ohne Anwendung der zeitintensiven Methoden für Gewebeextraktion erreicht. Der wichtigste Vorteil dieser Protokolle gegenüber enzymatischen Methoden ist, dass die Ergebnisse von der Extraktionsprozedur nicht beeinflusst werden.

Auch eine Immunfärbung in der Sandwichkultur ist mit nur noch wenigen Einschränkungen möglich.

Die etablierten Protokolle sind eine Voraussetzung dafür, dieses Kultursystem für Signaltransduktionsanalysen verwenden zu können, und erlauben es, die Monolayer- und Sandwichkultur weitergehend vergleichend zu charakterisieren (siehe folgende Kapitel).

3.3 Untersuchungen zur Polarität in Monolayer- und Sandwichkulturen

Nachdem in den vorangegangenen Arbeiten die grundlegenden Techniken zur genaueren Analyse von Gen- und Proteinexpressionsprofilen etabliert wurden, sollte nun die Sandwichkultur im Vergleich zur Monolayerkultur genauer charakterisiert werden.

Im Folgenden sind Immunfärbungen, Western Blots, PCRs sowie Mikroarrays aus verschiedenen Kulturen dargestellt. Für eine bessere Zuordnung und Korrelation der Ergebnisse werden diese Kulturen als ML1 – ML5 (Monolayerkulturen) und SW1 - SW9 (Sandwichkulturen) bezeichnet. Dabei stammen in der Regel die Zellen für jede Kultur aus je einer Isolierung, also aus je einer Maus. Wo Zellen aus der gleichen Maus für je eine Sandwich- und eine Monolayerkultur verwendet wurden, ist dies im Text erwähnt.

3.3.1 Monolayerkultur

Wie der FDA-Test zeigt (Abbildung 3.13), bilden die Zellen in Monolayerkultur (bei 75.000 Zellen/cm²) am Tag 1 funktionelle Gallenkanälchen, was auf eine polarisierte Kultur hindeutet. Mittels Immunfärbung wurde die erwartete Lokalisierung der ausgewählten Polaritätsmarker nachgewiesen, allerdings wurden auch erste Zeichen einer Dedifferenzierung beobachtet (siehe Abbildung 3.17 oben): Nicht alle Zellen sind gleich polarisiert, einige Hepatozyten bilden Kontakte zu den benachbarten Zellen, wie in der β -Catenin- und E-Cadherin-Färbung zu sehen ist (weißer Pfeil), andere hingegen exprimieren kein E-Cadherin (gelber Pfeil). Anhand einer ZO-1-Färbung sind relativ kleine aber deutlich definierte Gallenkanälchen erkennbar, die allerdings kein Netzwerk bilden. Eine genauere Betrachtung des Zytoskeletts lässt erkennen, dass sich Aktin (Phalloidin-Färbung) nur teilweise an der Membran konzentriert und Stressfasern bildet. Die Tubulinfärbung zeigt eine relativ kompakte Organisation der Mikrotubuli. Im Gegensatz zu der Situation am Tag 1 kann am Tag 3 in der Monolayerkultur eine stärkere Dedifferenzierung beobachtet werden (siehe Abbildung 3.17 unten). Die zytoplasmatische Expression von β -Catenin nimmt zu, und sogar Zellen, die enge Nachbarn haben, verlieren die Expression von E-Cadherin an der Membran. Die *Tight Junctions* (ZO-1-Färbung) umgeben nur selten Gallengänge und sind meistens zufällig verteilt. Des Weiteren ist ein Umbau des Zytoskeletts nachweisbar: Die Mikrotubuli sind lang und richten sich parallel zueinander aus, und die Aktin-Stressfasern sind noch deutlicher.

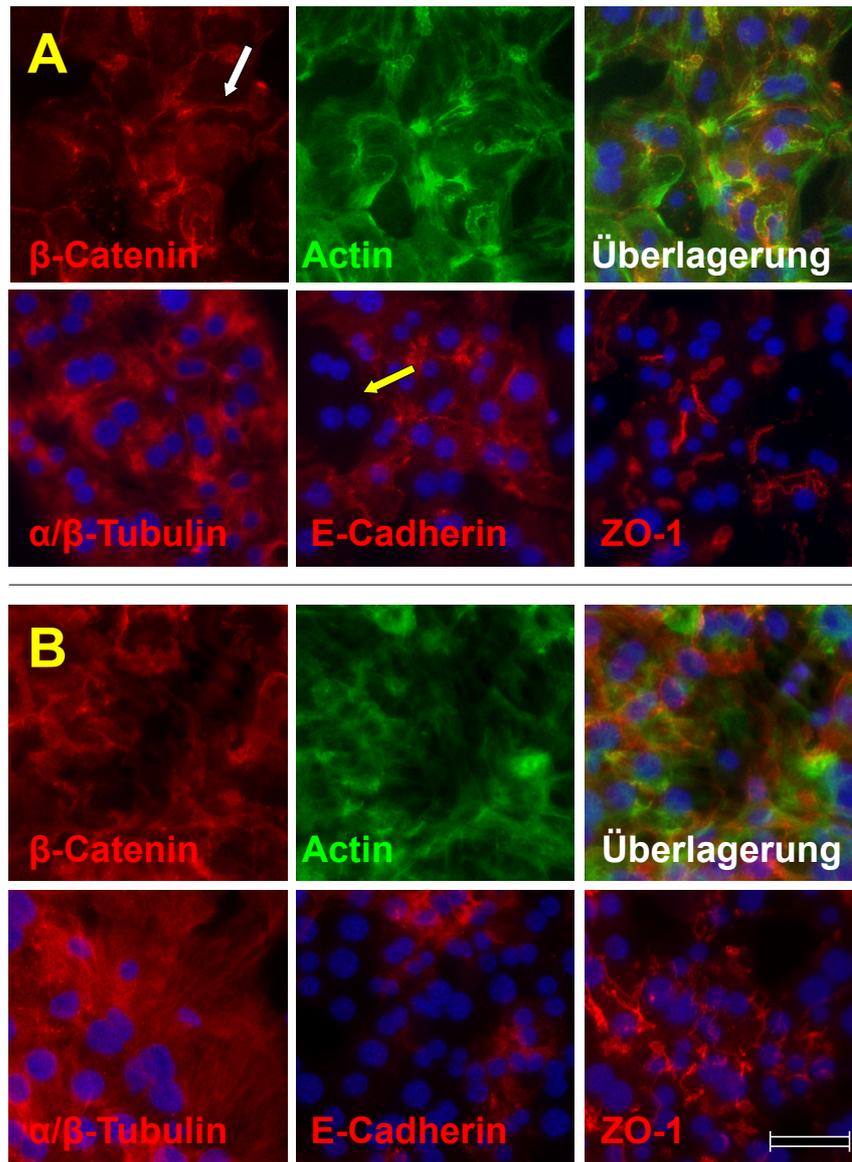


Abbildung 3.17: Immunfärbungen einer Monolayerkultur am Tag 1 (oben) ML1 und Tag 3 ML4 (unten) DAPI blau; weißer Pfeil; Zell-Zell-Kontakte; gelber Pfeil: fehlende Expression von E-Cadherin; Messbalken 50 μ m

3.3.2 Sandwichkultur

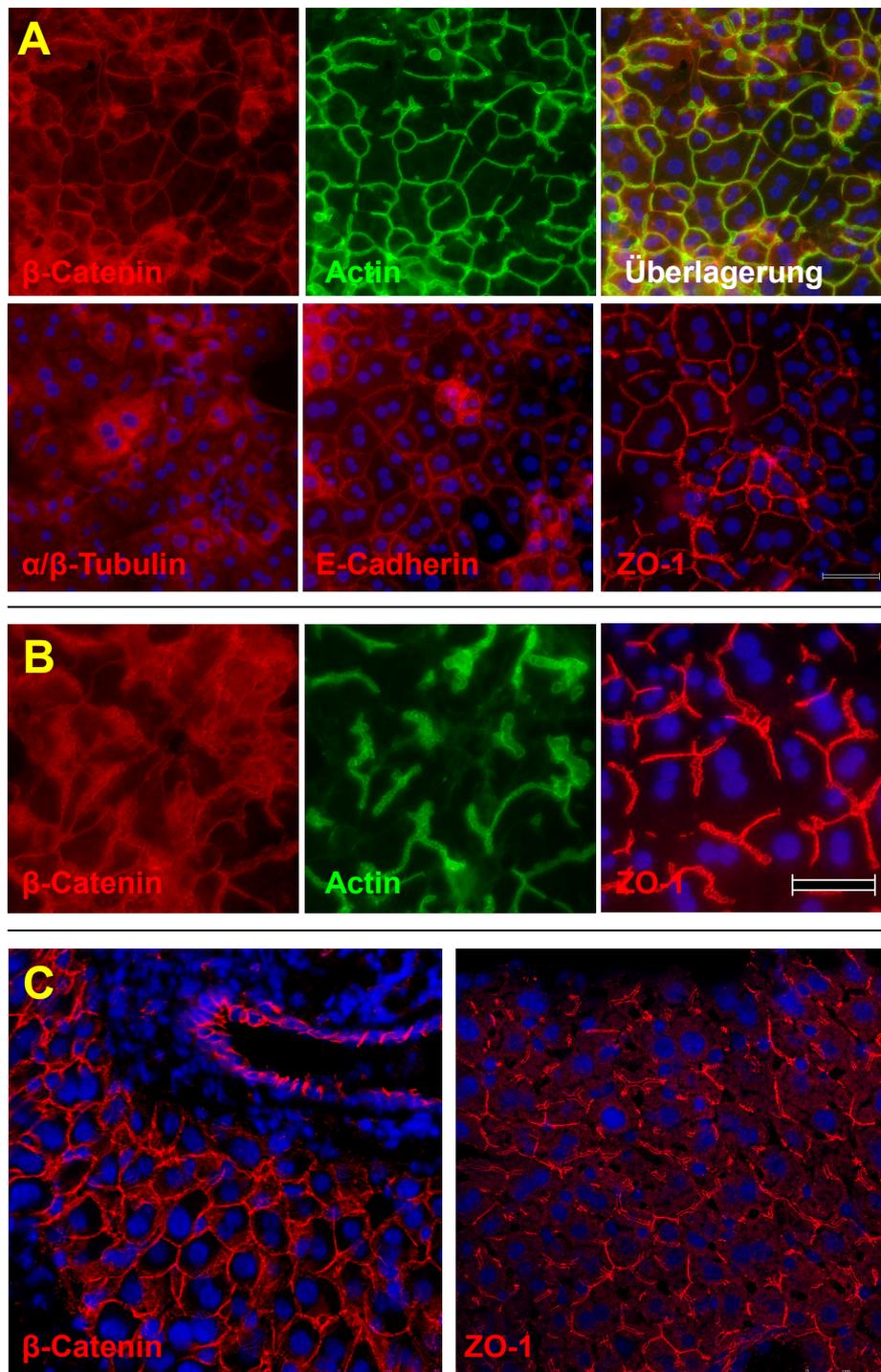


Abbildung 3.18: Immunfärbung in Sandwichkulturen und Leberschnitten. (A): Kultur SW3; (B): Kultur SW2; (C): Leberschnitte. Messbalken 50 μ m

Die Hepatozyten in einer Sandwichkultur am Tag 3 bilden viele Zell-Zell-Kontakte (siehe Catenin- und E-Cadherin-Färbung in Abbildung 3.18 A) und die ZO-1-Färbung zeigt ein gut ausgebildetes Netzwerk von Gallenkanälchen. Das Aktin-Zytoskelett bildet keine Stressfasern

und ist an der Membran lokalisiert, auch die Mikrotubuli sind relativ kompakt organisiert. Wie bereits erwähnt, können Sandwichkulturen mit Zellen aus verschiedenen Isolierungen unterschiedlich sein. So ist zum Beispiel die Polarität der Kultur SW2 (Abbildung 3.18 B) weniger gut entwickelt als bei der Kultur SW3 (Abbildung 3.18 A). Zum Vergleich mit dem *in-vivo*-Zustand ist die Lokalisierung von β -Catenin und ZO-1 in Leberschnitten¹⁹ dargestellt (Abbildung 3.18 C).

* *

Die Beweglichkeit der Zellen in der Monolayerkultur, die für Epithelzellen unnatürlich ist [113], die morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts und der Polaritätsverlust deuten auf eine epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) hin. Dies ist ein Vorgang, der auch unter pathologischen Bedingungen wie Krebs oder Fibrose stattfindet. Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Ito-Zellen die Hauptrolle bei der Leberfibrose spielen [114], [115], allerdings haben neue Studien gezeigt, dass auch Hepatozyten eine fibrotische Transformation *in vivo* vollziehen können [116].

Im Gegensatz dazu zeigen die Morphologie und die Verteilung der Polaritätsmarker in der für murine Hepatozyten etablierten Sandwichkultur (wie auch in entsprechenden Kulturen mit Rattenzellen beobachtet [25]) eindeutig, dass die Zellen wieder eine Polarität ausbilden.

Genauere Untersuchungen der Monolayer- und Sandwichkultur hinsichtlich der Transformation sind in Kapitel 3.6 beschrieben.

¹⁹ Die Leberschnitte wurden von Isabell Schulz präpariert und gefärbt.

3.4 Reaktion auf Interleukin-6 in Monolayer- und Sandwichkultur

Interleukin-6 (IL-6) ist bekannt als pleiotropes Zytokin, das eine wichtige Rolle bei Immunantwort, Apoptose und Proliferation spielt [47], indem es drei Signalwege aktiviert: JAK/STAT, MAPK, PI3K/Akt [39].

Nach der Etablierung der wesentlichen Grundtechniken für die Sandwichkultur für murine Hepatozyten wurde nun, wie geplant, der IL-6-Signalweg in Monolayer- und Sandwichkulturen primärer Hepatozyten untersucht.

Um die Aktivierung der erwähnten Signalwege nachzuweisen, wurde die Expression folgender Proteine im Western Blot analysiert²⁰: P-STAT3 (Tyr 705 und Ser 727), SOCS3, P-ERK1/2 (Thr 204/Tyr 202), P-Akt Thr (308 und Ser 473). Der Kerntransport von STAT3 nach der Stimulation wurde durch Immunfärbung²¹ und Western Blot von Kern- und Zytoplasmaextrakten untersucht. Als Marker einer antiapoptotischen Wirkung von IL-6 wurde BclXL [117] ausgewählt. Der Nachweis erfolgte auf Proteinebene, da die Regulation der Genexpression auch posttranskriptional erfolgt [118].

Die Rolle von IL-6 als Mitogen ist sowohl in *in vivo*- als auch in *in vitro*- Studien umstritten. Einige Publikationen besagen, dass IL-6 *in vivo* die Proliferation der Hepatozyten stimuliert [119]. Andere kommen zu dem Schluss, dass der mitogene Effekt nur teilweise auf die Aktivierung von STAT3 zurückzuführen ist, und die gleichzeitige Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch IL-6 für eine vollständige Regeneration notwendig ist [120]. Um den Einfluss von IL-6 auf den Zellzyklus in Hepatozytenkultur zu ermitteln, wurde Cyclin D1 untersucht, weil die D-Cycline notwendig und limitierend während der G1-Phase des Zellzyklus sind [121].

Als Zeitpunkte für die Analyse (gleichzeitig Dauer der Stimulation) wurden 30 min, 1h, 2h und 6h gewählt, um sowohl eine schnelle als auch eine spätere Antwort beobachten zu können. Für einige Kulturen wurde die Reaktion auch nach 24h untersucht. Die verwendete Konzentration von IL-6 betrug 20 ng/ml, was etwa der physiologischen Konzentration entspricht.

Eine semiquantitative Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse wurde nach dem in dieser Arbeit etablierten Verfahren durchgeführt. Höhere Werte bei unterschiedlichen Proteinen sind kein Indikator für stärkere Expression, weil die Menge an gebundenem Antikörper nicht nur von der Proteinquantität sondern auch von der Affinität bzw. Avidität des Antikörpers abhängt. Um die Zeitverläufe verschiedener Proteine miteinander vergleichen zu können,

²⁰ Die Auswahl der Marker war teilweise durch Verfügbarkeit von passenden Antikörpern bedingt.

²¹ Statt P-STAT3 wurde STAT3 gefärbt, weil ein geeigneterer Antikörper zur Verfügung stand. Da STAT3 nur phosphoryliert in den Kern gelangt, hat die Färbung im Kern die gleiche Bedeutung.

wurden die bereits auf Housekeeping normierten Werte anschließend auf die entsprechende Kontrollprobe (nicht stimulierte Zellen) bezogen. Die resultierenden Zahlen geben dann das Verhältnis an, um den ein Protein gegenüber der Kontrollprobe hoch- bzw. herunterreguliert wurde. Als Ladungskontrolle (Housekeeping) wurden GAPDH, β -Actin oder eEF2 verwendet. Die Auswahl wurde fallspezifisch getroffen, weil keines dieser drei Proteine tatsächlich immer konstant ist: GAPDH wird in Sandwich- etwas höher als in Monolayerkulturen exprimiert, β -Actin wird mit der Dedifferenzierung stärker exprimiert, und eEF2 fehlt komplett in seneszenten Zellen ([122]).

Bei P-STAT3 (Ser 727), P-Akt (Thr 308), P-Akt (Ser 473), SOCS3 und BclXl waren weder bei Monolayer- noch bei Sandwichkulturen im Western Blot signifikante Veränderungen nach der Stimulation mit IL-6 zu beobachten. Daher sind im Folgenden nur die Ergebnisse für P-STAT3 (Tyr 705), P-ERK (Thr 204/Tyr 202) und Cyclin D1 betrachtet.

Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils mindestens drei Kulturen mit IL-6 stimuliert und analysiert: ML1-ML3 (Monolayerkulturen, stimuliert am Tag 1 nach der Isolierung), ML4-ML6 (Monolayerkulturen, stimuliert am Tag 3 nach der Isolierung) und SW1-SW4 (Sandwichkulturen, stimuliert am Tag 3 nach der Isolierung).

* *

Für die Auswertung der folgenden Experimente ist es wichtig anzumerken, dass eine höhere Vitalität der Zellen nach der Isolierung auch für die Kultur üblicherweise als Vorteil angesehen wird. In Abbildung 3.19 sind verschiedene Hepatozytenkulturen mit dem jeweiligen Anteil lebender Zellen nach der Isolierung dargestellt²². Abbildung 3.19 A1 und B stellt die Lokalisierung der *Tight Junctions* (TJ) in Monolayer- bzw. Sandwichkulturen dar. Gelbe Pfeile markieren Gallenkanälchen, weiße Pfeile Stellen, an denen die TJ zwar vorhanden sind, aber keine Kanälchen umgeben, was bei nicht polarisierten Zellen auftritt. Wie in diesem Bild zu sehen, ist eine Monolayerkultur mit höherer Vitalität nach der Isolierung (82,6%) nicht notwendigerweise besser polarisiert. Die drei Monolayerkulturen, die am Tag 3 mit IL-6 stimuliert wurden, hatten Vitalitäten zwischen 74% und 75%, und bei keiner der betrachteten Eigenschaften waren Unterschiede sichtbar. Daher wurde in Abbildung 3.19 nur ML4 ausgewertet. Anders ist der Fall bei den Sandwichkulturen, wo die Kultur mit der höchsten Vitalität (84%) gleichzeitig das am besten ausgebildete Netzwerk von Gallenkanälchen aufweist. Für weitere Details zur Polarität in den Kulturen ML1, ML4, SW2 und SW2 siehe auch Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18.

²² Die Vitalität wurde sofort nach der Isolation der Zellen aus der Leber mittels Trypan-Blau-Färbung bestimmt (siehe Kapitel 2.1.1)

Für Monolayerkulturen wurde der Kerntransport von STAT3 als Reaktion auf eine Stimulation mit IL-6 mittels Immunfärbung analysiert (Abbildung 3.19 A2). Es wurde festgestellt, dass nach Stimulation am Tag 1 das Verhältnis zwischen den IL-6-Konzentrationen im Kern und im Zytoplasma, das an dem Kontrast der Färbung zwischen Kern und Zytoplasma abgelesen werden kann, je nach Kultur unterschiedlich ist. Am Tag 3 sind kaum Unterschiede zwischen Kern- und Zytoplasmafärbung zu beobachten. Eine Immunfärbung von STAT3 in Sandwichkultur war nicht möglich (siehe Kapitel 3.2.2)

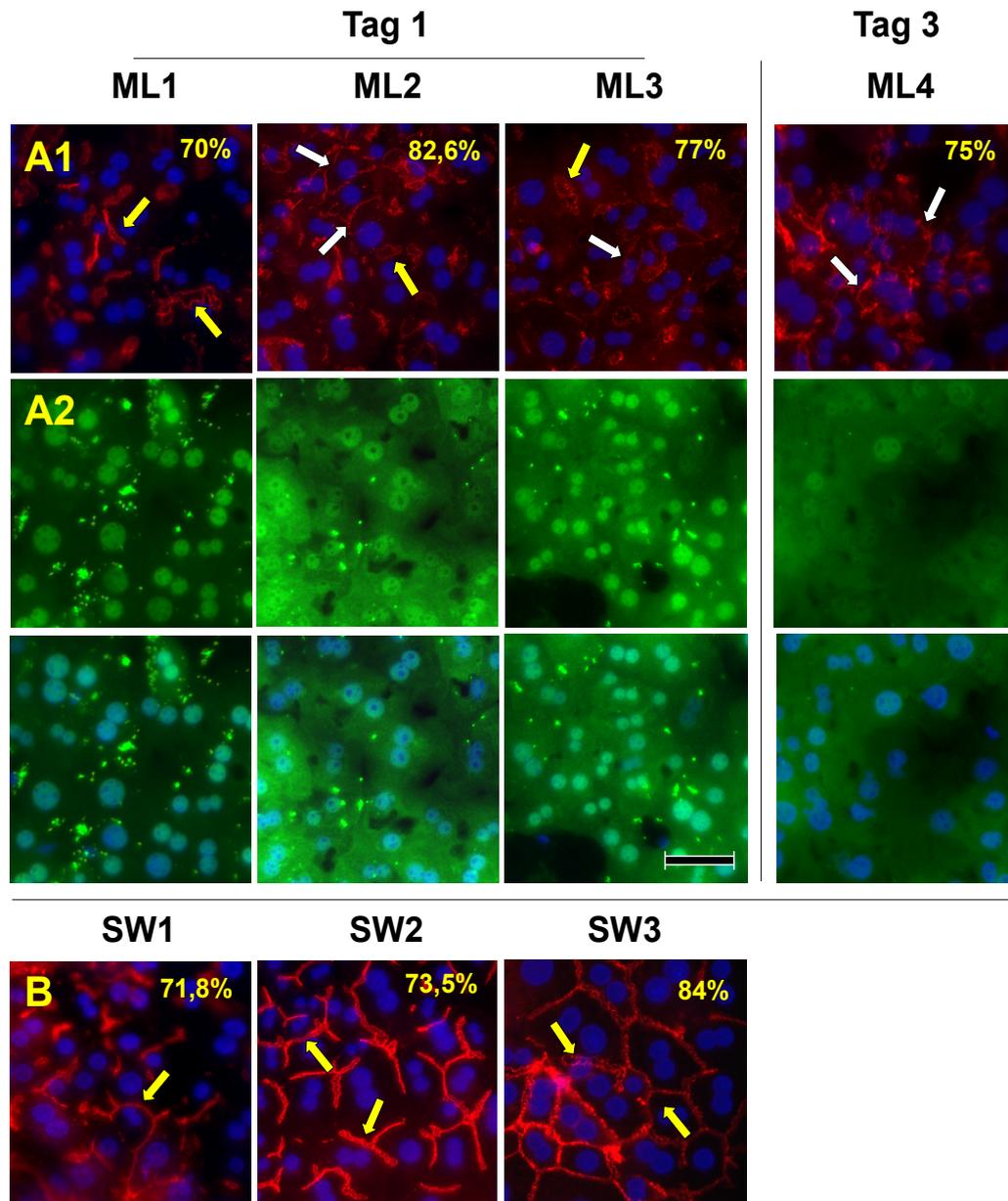


Abbildung 3.19: **Immunfärbungen in verschiedenen Kulturen.** TJ-Marker ZO-1 in Monolayer- (A1) und Sandwichkulturen (B), Angabe der Vitalität; STAT3 in IL-6 stimulierten Monolayerkulturen (30 min), (A2). DAPI (blau), gelbe Pfeile: Gallenkanälchen; weiße Pfeile: zufällige Lokalisierung von ZO-1; Messbalken 50µm

Des Weiteren wurden Proteinprofile nach der Stimulation mit IL-6 in Western Blot analysiert

(Abbildung 3.20) und quantitativ ausgewertet (Abbildung 3.21).

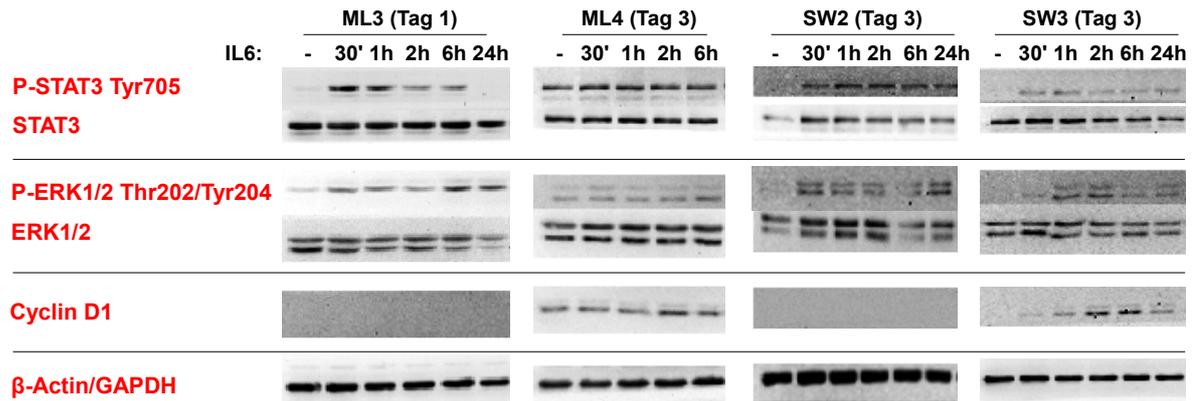


Abbildung 3.20: Western Blot in verschiedenen Kulturen.

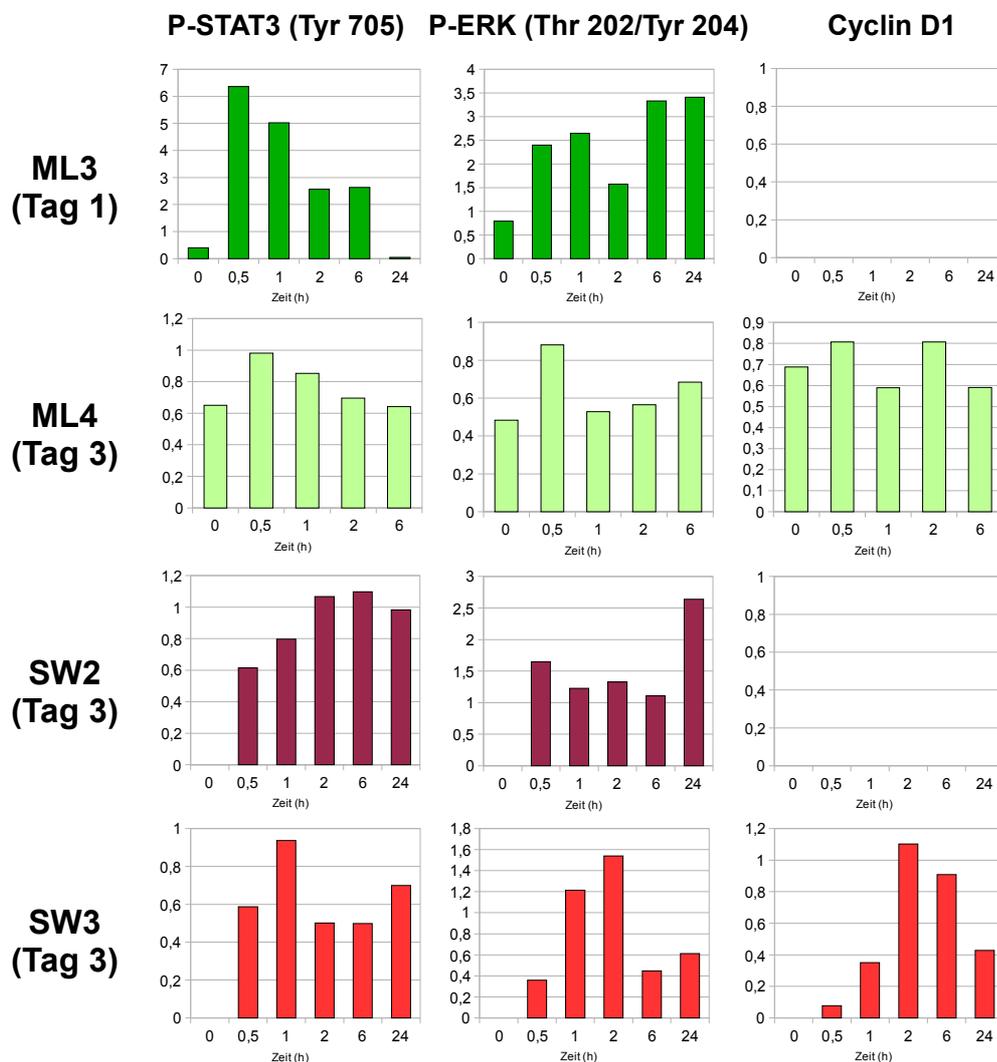


Abbildung 3.21: Semiquantitative Auswertung der Western Blots. Intensität normiert auf Housekeeping. Werte in nichtstimulierten Kontrollzellen sind als Zeitpunkt 0 dargestellt.

Trotz der Unterschiede in der Intensität der STAT3-Kernfärbung sind die wesentlichen Charakteristika der Proteinprofile in den Monolayerkulturen am Tag 1 qualitativ gleich. Daher wurde in den Abbildungen 3.20 und 3.21 ML3 als Beispiel für am Tag 1 stimulierten

Monolayerkulturen dargestellt. Auch die Proteinprofile der Monolayerkulturen am Tag 3 unterschieden sich wenig voneinander, repräsentativ ist die Kultur ML4 dargestellt. Die Proteinprofile der Kulturen SW1 und SW2 waren für alle untersuchten Proteine ähnlich (als Beispiel ist in Abbildung 3.20 links die Kultur SW2 dargestellt), bei SW3 waren allerdings nach der Stimulation mit IL-6 Unterschiede (zu sehen (Abbildung 3.20 rechts).

Für einen eindeutigen und direkten Vergleich wurden Proteinextrakte aus der Kontrollprobe und eine Stunde nach Stimulation von verschiedenen Kulturvarianten (ML2, ML6, SW3, SW4²³) in einem gemeinsamen Western Blot aufgetragen. Außer den bis jetzt betrachteten Proteinen wurde auch die Expression von α_2 Makroglobulin und Albumin analysiert.

Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Auswertung. Da alle Proben im gleichen Western-Blot analysiert wurden, können die Intensitätswerte direkt miteinander verglichen werden.

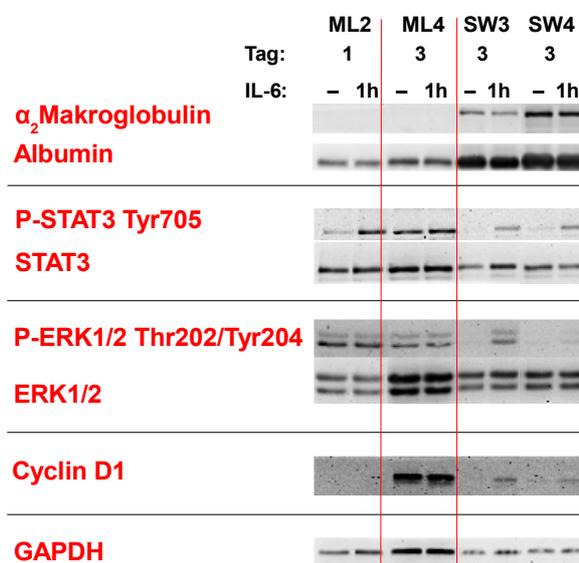


Abbildung 3.22: **Western Blot in Monolayer- und Sandwichkulturen.** Direkter Vergleich der Monolayerkulturen am Tag 1 und 3 und der Sandwichkultur am Tag 3.

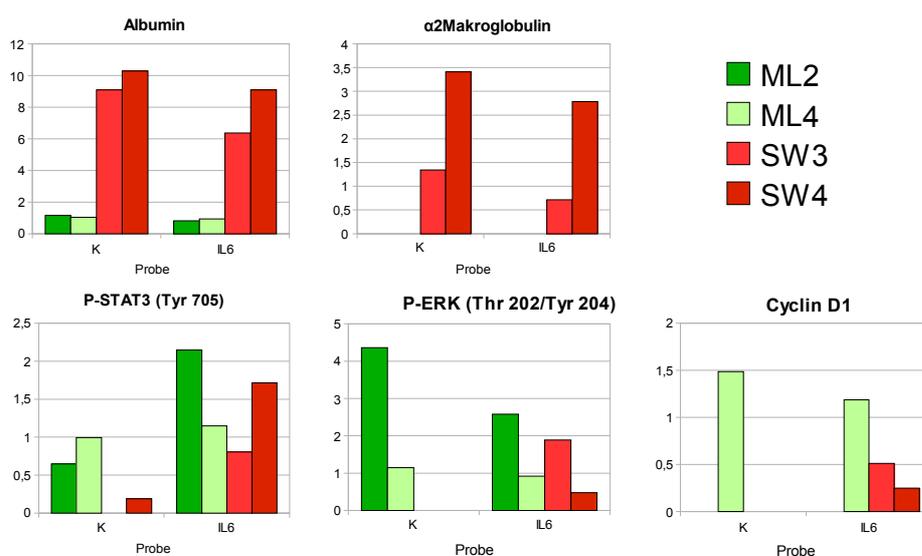


Abbildung 3.23: **Semiquantitative Auswertung des Western Blots.** Intensität normiert auf Housekeepingprotein.

23 Von der Sandwichkulturen SW1 und SW2 waren keine Proben mehr verfügbar.

* *

Nach einer Stimulation mit IL-6 wird die höchste Quantität an P-STAT3 nach 30 Minuten Stimulation erwartet, in der Regel gefolgt von einer Reduktion und einem zweiten, etwas geringeren Anstieg, nach dem die Wirkung abklingt.

Abgesehen von der schwachen konstitutiven Phosphorylierung von STAT3 (siehe Kontrollzellen in Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21) ist das Profil von P-STAT3 in der ML3 (Tag 1) dem erwarteten Verlauf am ähnlichsten. Am Tag 3 ist die konstitutive Phosphorylierung von STAT3 stärker ausgeprägt, und die Menge an P-STAT3 steigt nach Stimulation mit IL-6 nur noch gering an. Im Gegensatz zur Monolayerkultur ist STAT3 in keiner der Sandwichkulturen konstitutiv phosphoryliert. Bei den dargestellten Sandwichkulturen ähnelt der Zeitverlauf von P-STAT3 in SW3 stärker dem erwarteten Verlauf als in SW2, allerdings sind die Maxima im Verlauf später als erwartet, und die Wirkung klingt innerhalb des untersuchten Zeitraums von 24 Stunden nicht ab.

Auch bei ERK1/2 ist in allem Monolayerkulturen eine konstitutive Aktivierung sichtbar, während in den Sandwichkulturen P-ERK1/2 nur nach IL-6-Stimulation nachweisbar ist.

Die erwartete Aktivierung von Cyclin D1 nach einer Stimulation mit IL-6 wurde in Monolayerkulturen nicht beobachtet: Während das Protein am Tag 1 vollständig fehlt, wird es am Tag 3 unabhängig von IL-6 exprimiert. Auch in der Sandwichkultur SW2 war kein Cyclin nachweisbar. Allerdings konnten in der Kultur SW3 und in geringerem Maße auch in SW4 nach IL-6-Stimulation Cyclin D1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.20, Abbildung 3.22), in SW3 auch Cyclin E (nicht dargestellt).

Weiterhin ist offenbar α_2 Makroglobulin ausschließlich in Sandwichkulturen exprimiert und Albumin in höheren Quantitäten, was Indizien für aufrechterhaltene Leberfunktionen sind.

Eine Korrelation zwischen Vitalität der Zellen nach der Isolierung, Ausbildung der Polarität und Reaktion der Zellen auf die Stimulation mit IL-6 konnte bei den Monolayerkulturen nicht festgestellt werden. Bei den Sandwichkulturen hingegen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine höhere Vitalität die sowohl die Ausbildung von Gallenkanälchen als auch die Antwort auf IL-6 positiv beeinflusst: So ähnelt der Zeitverlauf von P-STAT3 in SW3, der Sandwichkultur mit der höchsten Vitalität (84%, verglichen mit 71,8% und 73,5% bei SW1 bzw. SW2), stärker dem erwarteten Verlauf als in SW2. SW3 hebt sich außerdem durch die von IL-6 abhängige Expression von Cyclin D1 und die stärker ausgeprägte Polarität (siehe Abbildung 3.18, Kapitel 3.3.2) von den anderen Sandwichkulturen ab. Da die Vitalität der Zellen, die für diese Arbeit zur Verfügung standen, selten über 80% lag, war es nicht möglich, einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Vitalität, Polarität und Expression von Cyclin D1 in Sandwichkultur nachzuweisen. Es gelang jedoch eine weitere Isolierung mit

Vitalität 81,6%, deren Zellen für die Kultur SW4 verwendet wurden. Diese Kultur zeigte ebenfalls eine Cyclin D1-Expression nach Stimulation mit IL-6 (siehe Abbildung 3.22).

Die konstitutive Aktivierung von STAT3 und ERK1/2 in Monolayerkulturen ist wahrscheinlich auf die Zell-EZM-Kontakte zurückzuführen. Es ist bereits bekannt, dass Hepatozyten auf Monolayerbeschichtung, anders als in Sandwichkultur, Kontakte mit der EZM durch Integrine bilden (Fokalkontakte) [123], [124], wodurch unter anderem ERK und STAT3 aktiviert wird [125], [126], [127]. Diese Fokalkontakte sind notwendig für die Fortbewegung der Zellen, allerdings sind Epithelzellen (also auch Hepatozyten) eigentlich nicht beweglich.

STAT3 inhibiert die Apoptose während einer Immunreaktion, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, in einer toxischen Umgebung zu überleben. Als Folge einer chronischen Entzündung der Leber können sich Krankheiten wie Leberfibrose, Zirrhose und hepatozelluläre Karzinome (HCC) entwickeln [128], [129]. Eine von Stimulation unabhängige Aktivierung von STAT3 wurde auch bei einigen Karzinomen beobachtet [130], daher kann anhand der P-STAT3-Profile eine ähnliche Transformation der Zellen in Monolayerkultur vermutet werden. Diese Vermutung wird gestützt durch die in den Kapiteln 3.1.2 und 3.3.1 beschriebene morphologische Dedifferenzierung der Zellen in der Monolayerkultur. Insofern erinnert die konstitutive Aktivierung von STAT3 am Tag 3 in der Monolayerkultur an Karzinomzellen oder an eine chronische Entzündung. Auch schon am Tag 1 zeigen die Kontrollzellen einer Monolayerkultur eine schwache Expression von P-STAT3 (Tyr 705) – das heißt, dass die eindeutige Transformation der Zellen am Tag 3 ein Prozess ist, der viel früher anfängt. Weitere Aspekte der Dedifferenzierung in der Monolayer- und Sandwichkultur sind in Kapitel 3.6 beschrieben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Monolayerkultur kein geeignetes System für *in vitro*-Untersuchungen von Prozessen in der gesunden, funktionellen Leber darstellt, allerdings weist der Zustand der Zellen, zumindest in den ersten Tagen der Kultur, Ähnlichkeiten mit einem Regenerationszustand auf, während dessen sich die Zellen zur Teilung stimulieren lassen [123]. Im Gegensatz dazu sprechen die Charakteristika der Sandwichkultur für einen vitalen Zustand der Hepatozyten, so sind die Polarisierung und der Stoffwechsel wesentlich besser als in der Monolayerkultur, und die Western Blot-Analysen zeigen, dass Proteine wie STAT3 und ERK1/2 in Sandwichkulturen nicht konstitutiv aktiv sind. Damit ist dieses Kulturmodell besser geeignet als die Monolayerkultur, um die Wirkung von Wachstumsfaktoren zu untersuchen, die den JAK/STAT- oder ERK-Signalweg aktivieren. Da

die Aktivierung von Cyclin D1 nur in einzelnen Sandwichkulturen beobachtet werden konnte, ist eine Weiterentwicklung der Kulturtechnik wünschenswert, die diese Variationen zwischen einzelnen Kulturen minimiert.

Im nächsten Kapitel wird die Eignung der Sandwichkultur für Studien von Endozytose und Signaltransduktion am Beispiel des IL-6-Signalwegs untersucht.

3.5 Endozytose in Hepatozytenkulturen

Das neu etablierte Kultursystem für murine Hepatozyten soll im Rahmen des BMBF-Projekts Endosys („Systems Biology of Hepatocyte Endocytosis“) von Kooperationspartnern verwendet werden, um Endozytoseprozesse in primären Hepatozyten zu untersuchen. Um zu prüfen, ob dieses Systems geeignet ist, die in Endosys vorgesehenen Fragestellungen zu bearbeiten, wurden die bereits durchgeführten Untersuchungen am Interleukin-6-Signalweg um Experimente zur Rolle der Endozytose bei der Signalweiterleitung erweitert.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind in der Literatur erste Erkenntnisse über die Rolle der Endozytose bei der Signalweiterleitung im JAK/STAT3-Signalweg beschrieben: Shah et al. ([45]) haben gezeigt, dass STAT3 mit den frühen Endosomen kolokalisiert, und Bild et al. konnten die Notwendigkeit der Endozytose beim Kerntransport von STAT3 nach der Stimulation mit EGF nachweisen ([44]).

In dieser Arbeit wurde die Reaktion auf IL-6 von primären Hepatozyten in Kultur mit oder ohne Behandlung mit Phenylarsinoxid (PAO) untersucht. PAO wird häufig als Endozytose-Inhibitor verwendet ([131], [67]), allerdings können zu hohe Konzentrationen oder zu lange Behandlungszeiten zu unerwünschten Nebeneffekten wie z.B. Änderung des ATP-Gehalts der Hepatozyten, Verlust der zellulären Integrität oder Zelltod führen ([131]). Deswegen war zunächst eine Optimierung der verwendeten Konzentration notwendig. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von PAO (1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 30 μM) getestet und die geringste ausgewählt, bei der noch der Kerntransport von STAT-3 nach der Stimulation mit IL-6 verhindert wird. Da die Monolayerkultur weniger robust als die Sandwichkultur ist, wurde die Arbeitskonzentration für die Monolayerkultur bestimmt und auch für die Sandwichkultur verwendet. Bei dieser PAO-Konzentration war auch in Sandwichkulturen ein deutlicher Effekt (Unterdrückung der Phosphorylierung von STAT3, Nachweis im Western Blot) sichtbar.

Die Wirkung von PAO auf mit IL-6 behandelte Zellen wurde auf Proteinebene in allen Kulturen untersucht. Um die von IL-6 beeinflussten Gene in Sandwichkulturen mit und ohne PAO-Behandlung zu ermitteln, wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt. Die Stimulationszeit für die Mikroarray-Analysen wurde auf eine Stunde festgelegt, da die Regulation der Gene nach der IL-6-Stimulation sehr schnell stattfindet.

* *

Das Protokoll für die Behandlung mit PAO wurde von Yumoto R et al. abgeleitet [67] (siehe auch Kapitel 2.1.5): Die Zellen wurden für 10 Minuten mit PAO inkubiert, gewaschen und anschließend in frischem Medium weiter kultiviert oder mit IL-6 stimuliert. Da eine zu hohe

PAO-Konzentration (ab 10 μM) nach einer Stunde²⁴ zu Integritätsverlust und Zelltod führt (siehe Abbildung 3.24 A) und zu geringe Konzentrationen ($\leq 2,5$ μM) kaum ein Effekt haben (nicht gezeigt), wurde eine Konzentration von 5 μM festgelegt. Bei dieser Konzentration wird der Kerntransport von STAT3 deutlich inhibiert (Abbildung 3.24 B2 im Vergleich zu B1). Zusätzlich wurden die mit 5 μM PAO behandelten Zellen auf Apoptose und Nekrose untersucht (Abbildung 3.24 C1), wobei mit 10 μM PAO behandelte Zellen als Positivkontrolle benutzt wurden (siehe Abbildung 3.24 C2). Auch dieser Test bestätigt, dass die Konzentration von 5 μM weder Apoptose noch Nekrose auslöst.

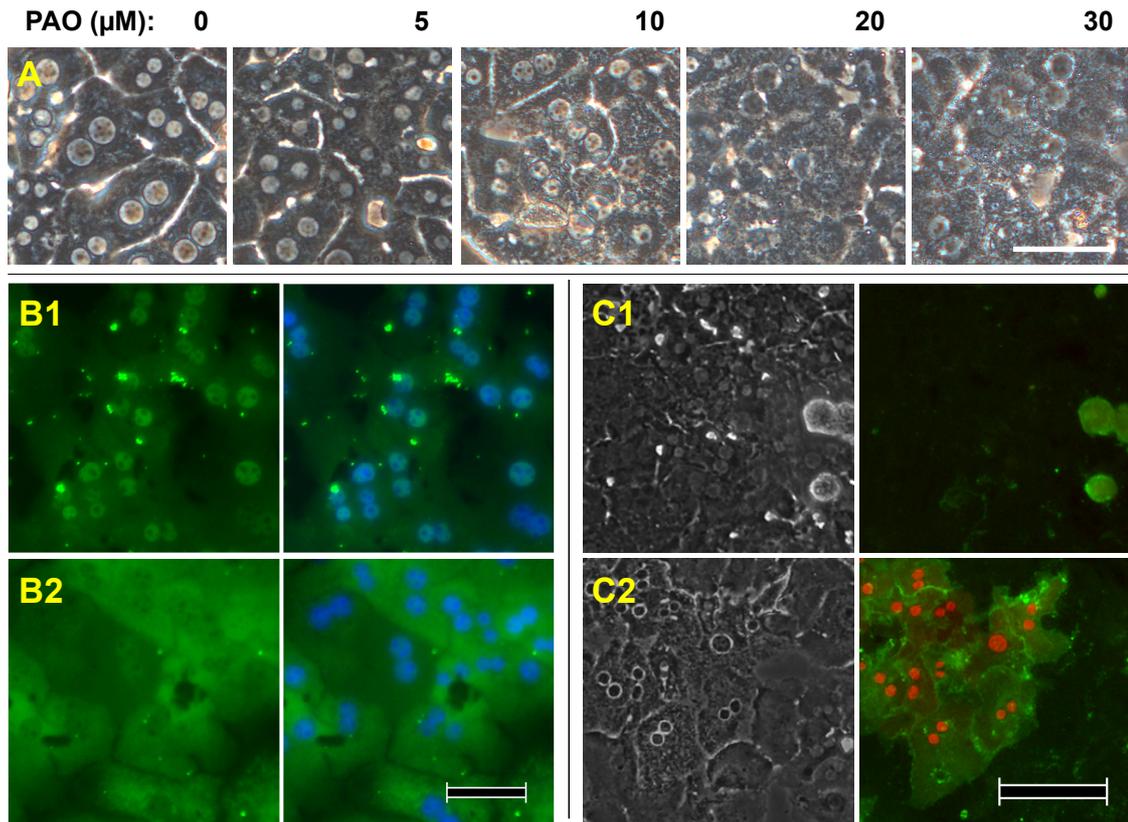


Abbildung 3.24: PAO-Wirkung in Monolayerkultur. (A): Hepatozyten eine Stunde nach Behandlung mit verschiedenen PAO-Konzentrationen; (B): Immunfärbung von STAT3 (grün) nach 30' Stimulation mit IL-6 in unbehandelten (B1) und mit 5 μM PAO behandelten Zellen (B2); DAPI (blau); (C): Annexin-V-Test nach Behandlung mit 5 μM (C1) und 10 μM (C2) PAO; apoptotische Zellen sind grün und nekrotische sowohl grün als auch rot angefärbt. Messbalken 100 μm

Des Weiteren wurden Proteinextrakte aus mehreren mit IL-6 stimulierten Monolayer- und Sandwichkulturen mit und ohne PAO-Behandlung im Vergleich mittels Western Blot analysiert. Jeweils eine repräsentative Monolayer- (ML3, siehe Abbildung 3.25 links) und Sandwichkultur (SW3, siehe Abbildung 3.25 Mitte) ist dargestellt, für SW3 zusätzlich Kern-

²⁴ Die Zeitangaben bei PAO-Experimenten beziehen sich auf die Kultivierungsdauer der Zellen nach der 10-minütigen PAO-Behandlung und anschließendem Waschen.

und Zytoplasmaextrakte. Die Proteine aus den mit PAO behandelten Kontrollzellen (ohne IL-6-Stimulation) wurden nach einer Stunde extrahiert. Um eventuelle zeitliche Veränderungen der Proteinprofile allein durch die PAO-Zugabe zu bestimmen, wurden für die Monolayerkultur ML4 solche Kontrolleextrakte an verschiedenen Zeitpunkten nach der PAO-Behandlung präpariert (Abbildung 3.25 rechts).

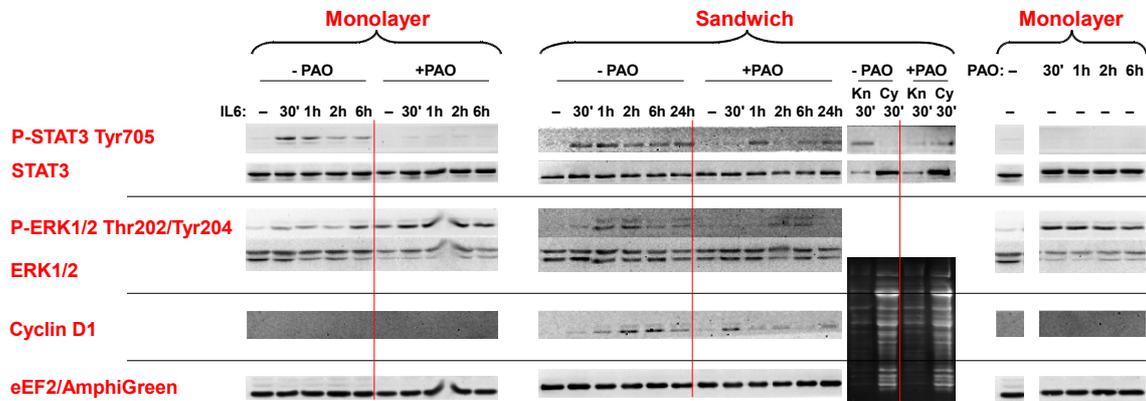


Abbildung 3.25: *Western Blot von Kulturen mit und ohne PAO-Behandlung.* Gesamtextrakte aus der Monolayerkultur ML3 (links); Gesamt-, Kern- (Kn) und Zytoplasmaextrakte (Cy) aus der Sandwichkultur SW3 (mitte); Gesamtextrakte aus ML4 nach Behandlung mit PAO allein (rechts).

Für die Kern- und Zytoplasmaextrakte ist in Abbildung 3.25 (Mitte) die AmphiGreen-Färbung der Membran²⁵ als Ladungskontrolle gezeigt.

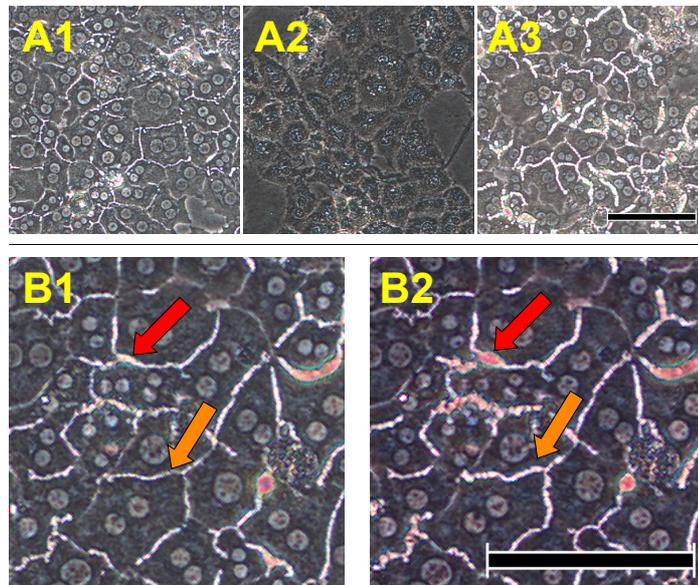


Abbildung 3.26: *PAO-Effekte in der Sandwichkultur.* (A): 24h nach PAO-Behandlung; unbehandelte Zellen (A1), tote Zellen (A2), Zellen mit breiten Gallenkanälchen (A3); (B): Veränderung der Kanälchen innerhalb von 72 Minuten, 6 h nach der Behandlung. Gleichfarbige Pfeile markieren dieselben Gallenkanälchen zu beiden Zeitpunkten. Messbalken 100 μm

Des Weiteren wurde in Sandwichkulturen beobachtet, dass 24 Stunden nach der Behandlung mit PAO folgende Effekte auftreten: Ein gewisser Anteil der Zellen stirbt ab (Abbildung 3.26 A2), während sich bei den überlebenden Zellen die Gallenkanälchen erweitern (Abbildung 3.26 A3). Als Vergleich ist in Abbildung 3.26 A1 eine unbehandelte Kultur zum gleichen Zeitpunkt gezeigt. In Abbildung 3.26 B1 und B2 ist die Erweiterung der Gallenkanälchen innerhalb von 72 Minuten dargestellt.

Für Mikroarrayanalysen wurden die Hepatozyten mit IL-6 (eine Stunde Stimulation), PAO (10 Minuten Behandlung und anschließend eine Stunde Kultivierungszeit) oder mit beiden gleichzeitig (10 Minuten PAO-Behandlung und anschließend eine Stunde IL-6-Stimulation) behandelt, und als Kontrolle wurden nicht behandelte Zellen analysiert. Die vier verschiedenen Behandlungen werden im Weiteren als „IL-6“, „PAO“, „IL-6 PAO“ bzw. „K“ bezeichnet. Drei unabhängige Kulturen (SW5, SW6 und SW7) mit ähnlicher Zellvitalität nach

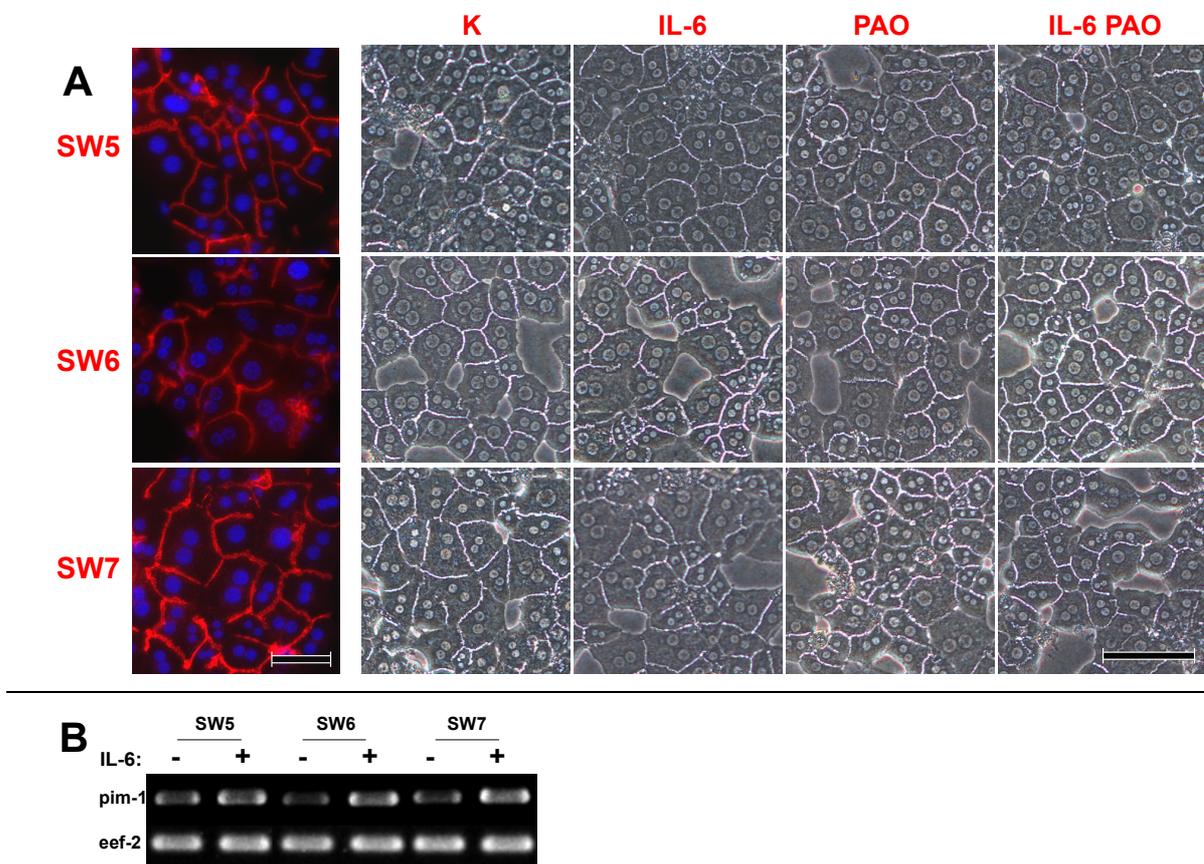


Abbildung 3.27: Kulturen für Mikroarrays. (A): Ausgewählte Wells für die RNA-Extraktion. Immunfärbung von ZO-1 (links) und Phasenkontrastbilder (rechts); Messbalken 50 μm (links) und 100 μm (rechts); (B): Validierung der Mikroarrayergebnisse.

der Isolierung (70-70,5%) und vergleichbarem Polarisierungszustand (siehe Abbildung 3.27 A) wurden dafür verwendet. Für die RNA-Extraktion wurden Wells ausgesucht, die auch optisch ähnlich waren. Die RNA-Extrakte wurden der Firma *Miltenyi Biotec* zur Hybridisierung von Mikroarrays und für eine bioinformatische Auswertung geschickt.

Die Mikroarrayanalysen wurden mittels PCR validiert, als Beispiel ist die Expression des nach IL-6-Stimulation hochregulierten Gens Pim-1 in Abbildung 3.27 B dargestellt. Verhältnisse zwischen Expressionsniveaus in den unterschiedlich behandelten Zellen und den Kontrollzellen der gleichen Maus (IL-6/K, IL-6 PAO/K und PAO/K) wurden von *Miltenyi Biotec* berechnet. Dabei wurde ein Gen als signifikant reguliert betrachtet, wenn es in allen 3 Mauszellkulturen signifikant entweder hoch- oder herunterreguliert war. Details zur statistischen Auswertung befinden sich im Anhang F. Die signifikant regulierten Gene nach der IL-6-Stimulation sowie ihre Expression nach der kombinierten Behandlung sind in Anhang F3 aufgelistet. Die für diese Gene ermittelten Daten wurden einer eigenen Auswertung unterzogen. Bei der Kategorisierung der Gene wurden, um einige Effekte besser isoliert betrachten zu können, zunächst folgende Verhältnisse mit der angegebenen Bedeutung berechnet:

- **IL-6/K**: Wirkung von IL-6 alleine
- **IL6 PAO/PAO**: Wirkung von IL-6-auf mit PAO-behandelte Zellen. Der Vergleich mit IL-6/K gibt Hinweise, ob und wie PAO die Wirkung von IL-6 auf das jeweilige Gen beeinflusst. Ein Unterschied zu IL-6/K kann aber auch an der Überlagerung der isolierten Wirkungen von PAO und IL-6 liegen.
- **PAO/K**: Wirkung des Inhibitors alleine
- **IL6 PAO/IL6**: Wirkung von PAO auf IL-6-stimulierte Zellen. Liefert im Vergleich mit PAO/K Indizien, ob PAO den Effekt von IL-6 auf das jeweilige Gen tatsächlich inhibiert, oder eine Verringerung der IL-6-Wirkung durch PAO evtl. darauf zurückzuführen ist, dass PAO direkt eine gegenteilige Wirkung entfaltet.
- **IL6 PAO/K**: Kombinierte Wirkung von PAO und IL-6

Auf Basis dieser Werte können 6 Arten von Effekten auf die Genexpression unterschieden werden, die die gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkungen von IL-6 und PAO auf das jeweilige Gen und die Wechselwirkungen zwischen beiden Behandlungen widerspiegeln. Die Klassen sind vollständig in Anhang F3 aufgelistet. Da nur die Ergebnisse aus der ersten Klasse klare Schlüsse zulassen, werden nur diese hier dargestellt (siehe Abbildung 3.28):

1. *Auf diese Gene hat PAO alleine keine Wirkung, aber die Wirkung von IL-6 ist bei Anwesenheit von PAO vermindert, bei einigen fast vollständig deaktiviert.* Es lässt sich klar schlussfolgern, dass PAO die entsprechende Funktion von IL-6 inhibiert.

In Abbildung 3.28 sind repräsentativ nur die Werte der aus Maus 1 gewonnenen Zellen dargestellt.

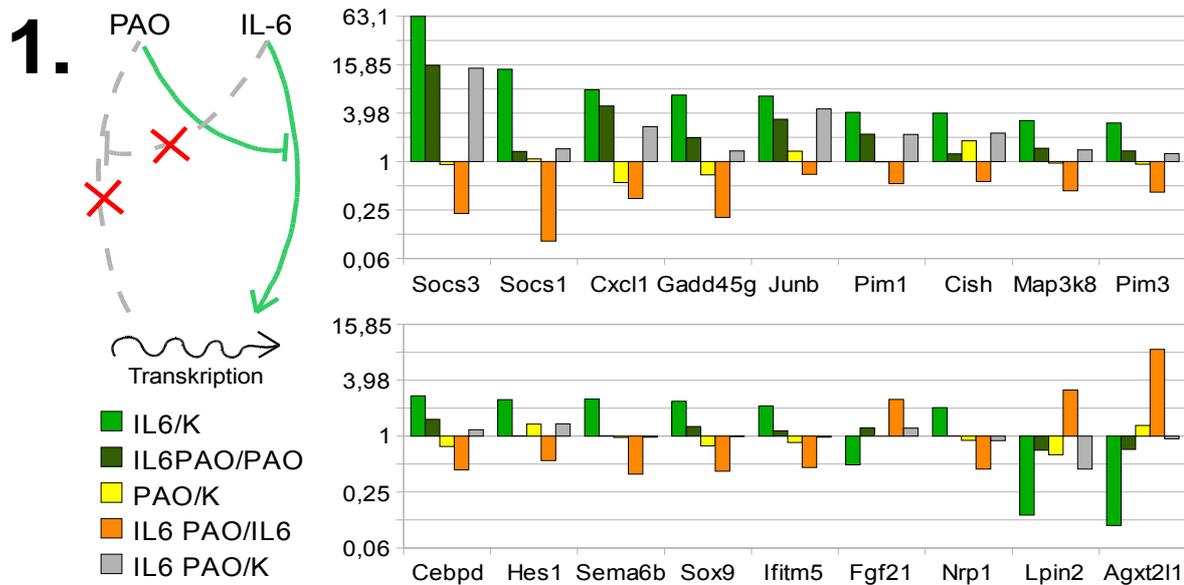


Abbildung 3.28: **Gene der Gruppe 1.** Die y-Achse (logarithmisch skaliert) zeigt den Faktor, um den das Expressionsniveau eines Gens verändert wurde. Werte über 1: Hochregulation; Werte unter 1: Herunterregulation.

* *

Es ist schwierig, eine geeignete PAO-Konzentration zu wählen, die zwar die Endozytose deutlich inhibiert, aber nicht letal auf die Zellen wirkt. Endozytose und Vesikeltransport sind Prozesse, die nicht nur bei Signalweiterleitung nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. Deswegen kann angenommen werden, dass eine vollständige Inhibierung solcher Prozesse zum Tod der Zellen führt. Sowohl die Proteinanalysen als auch die Ergebnisse der Mikroarrays zeigen, dass PAO allein schon die Zellen beeinflusst. Eine PAO-Konzentration von 5 μM hat sich in den Vorversuchen als optimal herausgestellt, um die kurzfristige Wirkung von IL-6 (z.B. Phosphorylierung von P-STAT3) zu inhibieren. Bei dieser Konzentration sind aber in Monolayerkultur nach 24 Stunden Kulturzeit bereits alle Zellen abgestorben. Eine noch geringere PAO-Konzentration könnte zwar die langfristigen Wirkungen mildern, allerdings ist dann die kurzfristige Wirkung zu schwach, um einen sichtbaren Einfluss auf den IL-6-Signalweg auszuüben. In Sandwichkultur hängt die Überlebensrate der Zellen 24 Stunden nach der PAO-Behandlung mit der Anzahl und dem Volumen der ausgebildeten Gallenkanälchen zusammen. Die Ausweitung der Gallenkanälchen in mit PAO behandelten Kulturen spricht für eine hohe Aktivität der Zellen, sie scheinen das PAO dorthin zu transportieren, um die toxischen Effekte zu minimieren. Das Ausscheiden von PAO hilft allerdings nur begrenzt, weil die Gallenkanälchen in Sandwichkultur geschlossene Gefäße sind und kein Abtransport stattfinden kann. Bei Kulturen mit besonders vielen und gut ausgebildeten Gallenkanälchen ist der Effekt von PAO

schwächer und die Ausweitung der Kanälchen stärker.

In der Monolayerkultur sind von P-ERK1/2 nach den verschiedenen Behandlungen (IL-6, PAO, IL6 und PAO gleichzeitig) ähnliche Mengen zu beobachten (Abbildung 3.25 links und rechts). STAT3 wird von PAO alleine nicht phosphoryliert, und nach der kombinierten Behandlung mit IL-6 und PAO ist die Phosphorylierung inhibiert.

Die Kernextrakte der Sandwichkultur SW3 zeigen ohne den Einfluss von PAO eine deutlich erkennbare Kernlokalisierung von P-STAT3 (Tyr 705) nach Stimulation mit IL-6. Bei zusätzlicher PAO-Zugabe enthalten die Gesamtextrakte nur noch wenig P-STAT3, welches eher im Zytoplasma als im Kern lokalisiert ist. Die Reaktionen von P-STAT3 (Tyr 705) und P-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) erscheinen nach PAO-Zugabe verzögert.

Die verzögerte Aktivierung von STAT3 (Tyr 705) und ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) in der Kultur SW3 könnte dadurch zustande kommen, dass der Transport von PAO in die Gallenkanälchen ausreichend gut funktioniert, um binnen einer Stunde die PAO-Konzentration in den Zellen soweit zu verringern, dass der STAT-Signalweg aktiv werden kann. Sandwichkulturen mit weniger oder kleineren Gallenkanälchen können demnach die PAO-Konzentration nicht ausreichend reduzieren. Das könnte erklären, warum ihre Reaktion auf PAO drastischer ist und eher der von Monolayerkulturen ähnelt. So ist in der Kultur SW2 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte P-STAT3 (Tyr 705) nachweisbar, und ERK1/2 ist nach PAO-Behandlung unabhängig von der IL-6-Stimulation stärker phosphoryliert (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von STAT3 eindeutig von PAO unterdrückt oder verzögert wird (z.B. in SW3). Das bedeutet, dass die Endozytose notwendig für die Signalweiterleitung nach Stimulation mit IL-6 ist. Die Western-Blot-Experimente von Kernextrakten und Immunfärbungen zeigen die erwartete Inhibierung des Kerntransports. Allerdings ist, anders als von Bild et al. ([44]) beobachtet, in den Gesamtextrakten zu sehen, dass auch die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr 705 unterdrückt wird.

Anders als im Fall von STAT3, dessen Phosphorylierung, wie die Ergebnisse aus jeder Kultur bestätigen, von Endozytose abhängt, ist die Rolle der Endozytose bei der Aktivierung von ERK1/2 unklar. In den Monolayerkulturen ML1 und ML4 sowie den Sandwichkulturen SW1 und SW2 ist nach der PAO-Behandlung mehr ERK phosphoryliert, dagegen sind bei den Monolayerkulturen ML2 und ML3 keine Unterschiede zu sehen. Erst die verzögerte Reaktion in der Kultur SW3 lässt vermuten, dass die Phosphorylierung von der Endozytose abhängt. Es stellt sich allerdings die Frage, warum diese Kultur eine abweichende Reaktion zeigt. In allen Kulturen, mit Ausnahme von SW3, ist ERK1/2 bereits in den PAO-Kontrollextrakten

(Behandlung mit PAO, keine IL-6-Stimulation) phosphoryliert. Dies zeigt, dass PAO alleine diese Phosphorylierung bewirken kann. Unter der Voraussetzung, dass das Anschwellen der Gallenkanälchen tatsächlich auf Ausscheidung von PAO zurückzuführen ist, lässt sich vermuten, dass die PAO-Konzentration in den Zellen der Kultur SW3 so schnell verringert wird, dass die Wirkung auf ERK deutlich schwächer ausfällt. Etwas später (verzögert gegenüber der Reaktion in Kulturen ohne PAO) ist sogar die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 und ERK zu beobachten.

Eine allgemeine Korrelationsanalyse der Genexpressionsdaten der 12 Experimente (drei Kulturen mit jeweils vier Behandlungen) zeigt, dass die Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Behandlungen von Zellen der gleichen Maus größer sind als die zwischen gleichen Behandlungen in verschiedenen Mäusen/Kulturen. Aus diesen Gründen wurden keine klassischen statistischen Verfahren angewendet.

Die Mikroarrayanalysen zeigen zunächst, dass in den drei untersuchten Kulturen quantitative Variationen in der Genexpression vorkommen. Das ist nicht ungewöhnlich bei der Verwendung primärer Zellen, die individuumsspezifische Unterschiede aufweisen können. Die nach IL-6-Stimulation regulierten Gene spielen zum Teil eine Rolle bei Proliferation oder Entzündung, auch tumorspezifische Gene sind reguliert. Zum Beispiel werden *jun-B* und *gadd45* als unmittelbar frühe Gene („immediate early genes“) nach einer partiellen Hepatektomie hochreguliert [132]. *Pim-1* ist ein Proto-Onkogen [133], das zusammen mit *c-myc* eine Rolle beim Übergang von der G_1 - zu S-Phase spielt [55]. *Pim-3* ist häufig in hepatozellulären Karzinomen (HCC) exprimiert und notwendig für die Proliferation von daraus gewonnenen Zelllinien [134].

Für die Gene der Gruppe 1, ist eindeutig, dass die Endozytose für ihre Regulation notwendig ist. Obwohl IL-6 in der Sandwichkultur einige Proliferationsgene reguliert, sind andere typischerweise von STAT3 aktivierten Gene (z.B. *Cyclin-D1*, *-D2*, *-D3*, *-A*, *p21*, [46]) in diesen Kulturen in Vergleich zu Kontrollzellen nicht hochreguliert, und Zellteilung kann in Sandwichkultur nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass auch in der Sandwichkultur der Kerntransport von P-STAT3 von Endozytose abhängt, wie in der Literatur schon beschrieben. Somit ist die Sandwichkultur geeignet für die Analyse von Signalwegen, die Endozytose voraussetzen. Weiterhin ist aus diesen Ergebnissen erkennbar, dass, anders als bei dem EGF-Signalweg [44], nicht nur der Kerntransport sondern bereits die Phosphorylierung von STAT3 nach einer Stimulation mit IL-6 Endozytose voraussetzt.

Die unvollständige Aktivierung der IL-6-Zielgene sowie die Aktivierung einiger tumorspezifischer Gene stellt die Frage, ob die Hepatozyten in der Sandwichkultur trotz Ähnlichkeiten mit dem *in-vivo*-Zustand auch Anzeichen einer malignen Transformation aufweisen. Eine genauere Untersuchung der Transformation von Zellen in Monolayer- und Sandwichkulturen ist im folgenden Kapitel beschrieben.

3.6 Transformation in Hepatozytenkulturen

Primäre Hepatozyten in einer Sandwichkultur behalten länger und besser die *in-vivo*-ähnliche Morphologie sowie charakteristische Funktionen wie z.B. Albuminsekretion bei, allerdings lassen die morphologischen Veränderungen der Zellen im Randbereich (siehe Abbildung 3.6, Kapitel 3.1.3) sowie die Aktivierung einiger tumorspezifischer Gene (siehe Kapitel 3.5) eine epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) vermuten.

Um die in Monolayer- und in geringerem Maße auch in Sandwichkulturen beobachteten Transformationen besser zu charakterisieren, wurden Kulturen anhand verschiedener Marker analysiert. Als klassische epitheliale bzw. mesenchymale Marker wurden E-Cadherin bzw. Vimentin ausgewählt, und ihre Expression wurde sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene untersucht. Der Matrix-Abbau wurde mittels Expression von MMPs (Transkription von *mmp-2*, *mmp-9* und *mmp-13* und als Protein die aktive Form von MMP-9) nachgewiesen. Als Marker für die EZM-Synthese wurde Collagen I ausgewählt, weil es das von Hepatozyten am meisten synthetisierte Matrix-Protein ist ([135]). Da in der Sandwichkultur das von den Zellen synthetisierte Collagen von den Collagenresten der Beschichtung nicht unterscheidbar ist, wurde es nur auf Genebene untersucht, und das Protein Fibronectin wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Des Weiteren wurden in Proteinextrakten einer Kultur auch die Expression von ZO-1 und β -Catenin als TJ- bzw. AJ-Bestandteile sowie Albumin und Cyp 1A2 als Stoffwechselmarker untersucht.

* *

Zunächst wurden Zellen aus derselben Maus auf Monolayer- und Sandwichkultur (75.000 Zellen/cm²) ausgesät und RNA und Proteine am Tag 1, 3 und 6 extrahiert und analysiert. Dieses Experiment wurde mit zwei Mäusen durchgeführt, die Ergebnisse einer Maus (ML5 und SW8) sind im Folgenden als Beispiel dargestellt. Die charakteristische morphologische Veränderung der Zellen in beiden Kulturtypen ist in den Phasenkontrastbildern erkennbar (Abbildung 3.29 A1 (ML5) und A2 (SW8)). Die Expression von E-Cadherin, Vimentin, MMP-13, MMP-9, Collagen 1A1 wurde mittels PCR untersucht (Abbildung 3.29 B).

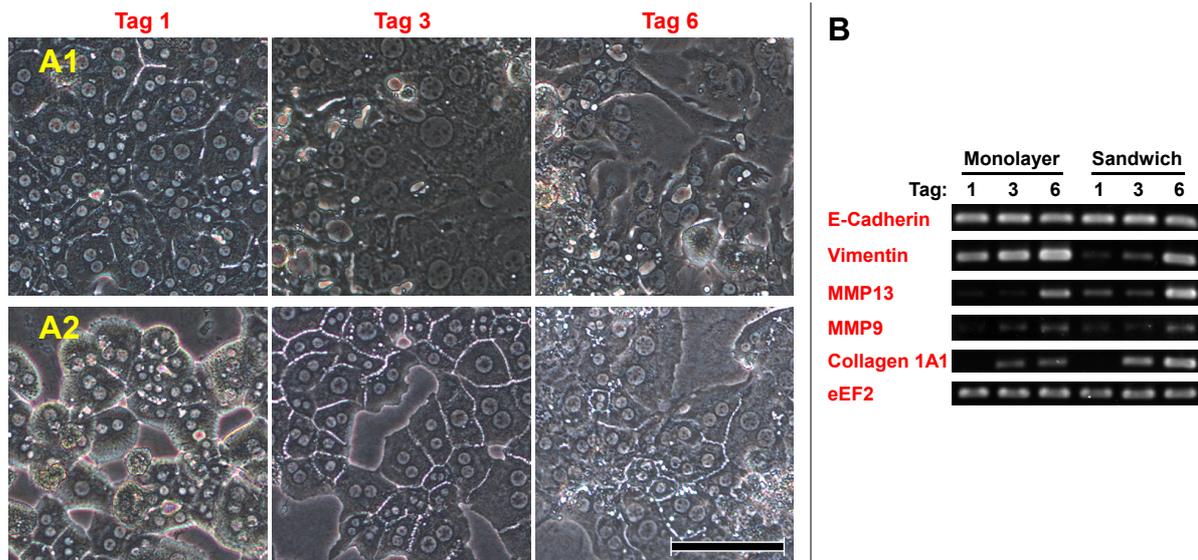


Abbildung 3.29: **Transformation in Hepatozytenkulturen.** (A): Phasenkontrastbilder einer Monolayerkultur (A1) und einer Sandwichkultur (A2), Messbalken. 100 μ m; (B): PCR-Nachweis für Transformationsmarker.

Des Weiteren wurde eine Sandwichkultur angesetzt (SW9), in der die Transformation im Detail verfolgt wurde. Dazu wurden sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression sowie die Lokalisierung verschiedener Marker betrachtet (siehe Abbildung 3.30).

Da eine morphologische Veränderung in Sandwichkulturen vor allem in Randbereichen beobachtet wurde, wurden im Folgenden zunächst die Genexpression von Zellen aus dem Rand- und Mittelbereich separat analysiert. Die getrennte RNA-Isolierung wurde folgendermaßen durchgeführt: Der Bioreaktor wurde auf Trockeneis gestellt und das Well zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurde mit einem Skalpell ein kreisförmiges Stück aus der Mitte des Wells herausgeschnitten. Der Randbereich wurde dann mit dem Skalpell vom Wellrand getrennt, und beide Regionen wurden unter dem Mikroskop kurz beobachtet, um sicherzustellen, dass der mittlere Bereich nur rechteckige Zellen enthielt. Die Sandwich-Konstrukte aus beiden Fraktionen wurden mit abgeschnittener Pipettenspitze in 2-ml-Gefäße überführt, und die RNA-Isolierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Die Ergebnisse der PCRs für die zwei RNA-Fractionen im Vergleich zum Gesamt-RNA-Extrakt am Tag 5 sind in Abbildung 3.31 A dargestellt. Des Weiteren wurden mögliche Unterschiede in der Collagenstruktur in der Mitte und am Rand eines Wells analysiert. Dafür wurde eine Collagenschicht ohne Zellen mit Antikörpern gegen Collagen I gefärbt und verschiedene Bereiche mit gleichen Mikroskopeinstellungen fotografiert (Abbildung 3.31 B).

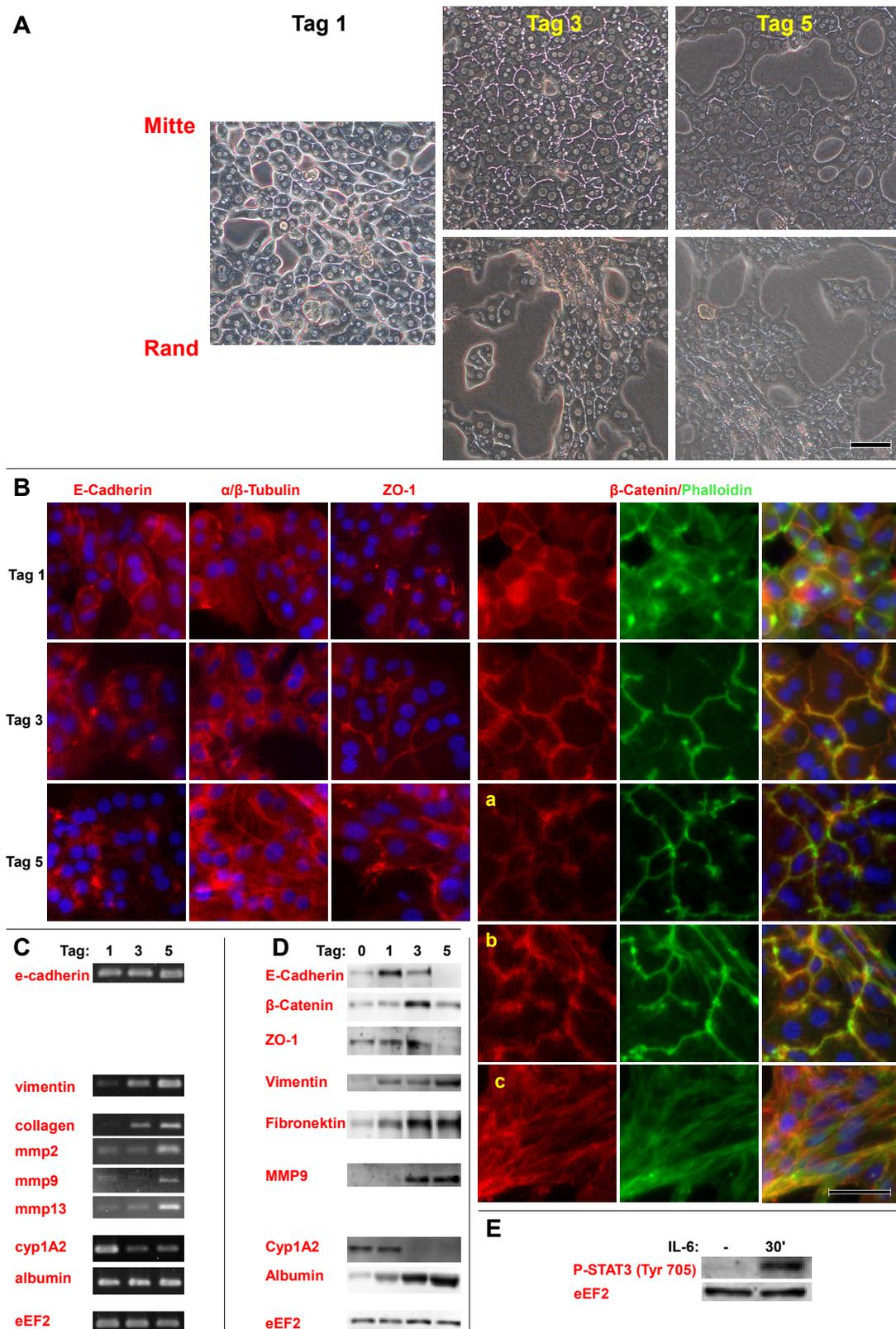


Abbildung 3.30: **Sandwichkultur SW9**. (A): Phasenkontrastbilder in der Mitte und am Rand eines Wells, Messbalken 100 μ m; (B): Immunfärbung von E-Cadherin, α/β -Tubulin, ZO-1, β -Catenin und Actin. Für die Färbung mit β -Catenin/Phalloidin sind für Tag 5 außerdem je eine Aufnahme in der Mitte (a), am Rand (c) und dazwischen (b) dargestellt, Messbalken 50 μ m; (C): Zeitverlauf der Expression verschiedener Gene (PCR) und (D) Proteine (Western Blot); (E): Phosphorylierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-6 am Tag 5, Western Blot.

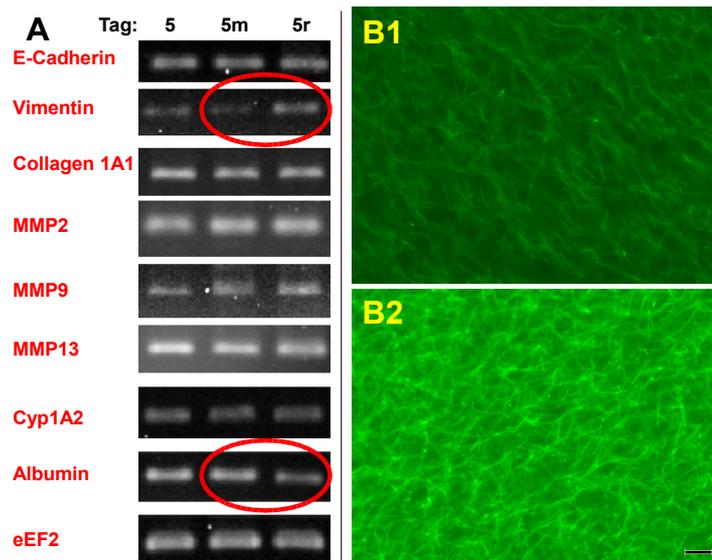


Abbildung 3.31: *Vergleich zwischen Mitte und Randbereich in Sandwichkultur.* (A): Genexpression (PCR) am Tag 5 im gesamten Well (5), in der Mitte (5m) und am Rand (5r). Unterschiede zwischen Mitte und Randbereich sind markiert; (B): Immunfärbung der Collagen-Fasern in der Mitte (B1) und am Rand (B2). Messbalken 100 μm

* *

Der Vergleich der Genexpression in Monolayer- und Sandwichkultur (Abbildung 3.29 B) zeigt, dass die Expression von E-Cadherin in beiden Kulturen konstant bleibt, obwohl Vimentin mit der Zeit hochreguliert wird (besonders stark in Monolayerkultur). Collagen I wird in Sandwichkultur stärker exprimiert, die Expression steigt aber in beiden Kulturen an. Auch bei MMP9 und MMP13 wird eine zunehmende Expression beobachtet, wobei MMP13 in der Sandwichkultur stärker exprimiert wird als in der Monolayerkultur.

Auch in der Kultur SW9 ist die morphologische Änderung der Zellen in den Randbereichen stärker ausgeprägt (Abbildung 3.30 A, vergleiche Mitte mit Rand). Ebenso sind in der Immunfärbung zeitliche Änderungen sichtbar (Abbildung 3.30 B): Die Lokalisierung von E-Cadherin an der Membran nimmt mit der Zeit ab, Tubulin bildet am Tag 5 lange Mikrotubuli, die am Tag 3 gut ausgebildeten TJ (ZO-1-Färbung) werden am Tag 5 weniger, die gestreckten Zellen am Tag 5 weisen ovale Kerne auf, schon am Tag 3 bilden einige Zellen intrazelluläre Actin-Fasern, und am Tag 5 zeigen die stark ausgestreckten Zellen deutliche Stressfasern (Tag 5 c), wobei β -Catenin an der Membran lokalisiert bleibt. Die Genexpressionsprofile für E-Cadherin, Vimentin, Collagen I, MMP-9 und MMP-13 ähneln der Expression in der Kultur SW8. Bei MMP-2 zeigt zunehmende, Cyp1A2 abnehmende Expression, während bei Albumin keine signifikanten Änderungen zu beobachten sind (Abbildung 3.30 C1). Der Western Blot (Abbildung 3.30 D) zeigt am Tag 1 eine stärkere Expression von E-Cadherin als am Tag 0 (eine Stunde nach der Aussaat), allerdings wird sie im weiteren Verlauf schwächer,

und am Tag 5 ist E-Cadherin nicht mehr nachweisbar. Ähnliche Profile sind für β -Catenin und ZO-1 zu beobachten. Vimentin und Fibronectin sind schon am Tag 0 schwach vorhanden, und ihre Menge nimmt weiter zu. Die aktive Form von MMP9 kann erst ab Tag 3 nachgewiesen werden. Weiterhin steigt die Albuminmenge mit der Zeit, aber Cyp1A2 kann nur am Tag 0 und 1 nachgewiesen werden. Trotz der sichtbaren Veränderungen der Kultur am Tag 5 wird keine konstitutive Phosphorylierung von STAT3 beobachtet (siehe Abbildung 3.30 E).

Die getrennte Analyse der Genexpression im mittleren Bereich und am Rand zeigt nur bei Vimentin und Albumin Unterschiede: Vimentin ist im Randextrakt höher exprimiert als in der Mitte, bei Albumin ist die Situation umgekehrt. Die Collagenmatrix scheint am Rand dichter zu sein (Abbildung 3.31).

Die steigende Expression vom mesenchymalen Marker Vimentin zusammen mit der konstanten Genexpression von E-Cadherin und die leicht steigende Expression von MMP9, MMP13 und Collagen 1A1 in der Monolayerkultur deutet auf *Scattering* hin. Einige Studien haben gezeigt, dass die Transformation der Hepatozyten in Monolayerkulturen nach Beschichtung der Zellen mit einer zweiten Collagenschicht reversibel ist ([26], [136]), allerdings wurden dabei nicht so extreme morphologischen Veränderungen und Polynuklearität beobachtet wie in dieser Arbeit (siehe Abbildung 3.3, Kapitel 3.1.2). Diese Veränderungen sowie die fehlende Antwort der Zellen auf IL-6 sind Merkmale seneszenten Zellen [137]. Auch die fehlende Expression des Housekeeping-Proteins eEF2 am Tag 6, sowie die sehr schwachen Signale bei allen anderen Proteinen mit Ausnahme des Zytoskelett-Proteins Vimentin (nicht dargestellte Ergebnisse) sprechen für Seneszenz (siehe auch Parrado et al., [122]).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beobachtete Transformation in der Monolayerkultur weniger einer EMT oder *Scattering* entspricht, sondern eher einer Alterung der Zellen.

In der Sandwichkultur deutet die Herunterregulation des leberspezifischen Proteins Cyp1A2 auf einen Funktionsverlust hin, trotz der konstant hohen Expression des Albumin-Gens und -Proteins. Die nur begrenzte Fähigkeit der Sandwichkulturen, den hepatischen Phänotyp aufrechtzuerhalten, wurde auch in anderen Studien festgestellt [138].

Die Regulation von E-Cadherin scheint posttranskriptional zu sein, da die Genexpression konstant bleibt, während die Proteinmenge, genauso wie die anderer Bestandteile der *AJ* und *TJ* (β -Catenin, ZO-1), mit der Zeit abnimmt. Auch in der Sandwichkultur wird eine steigende

Expression von Vimentin (Gen und Protein) beobachtet, allerdings viel schwächer als in Monolayerkulturen. Die Expression der MMP und Matrixproteine ist in der Sandwichkultur eindeutig höher als in Monolayerkultur, was bedeutet, dass diese Zellen ihre EZM stärker umbauen. Die Synthese von Collagen, Fibronectin und Laminin von Hepatozyten in Sandwichkulturen wurde bereits beschrieben [136]. Fibronectin wird typischerweise von Fibroblasten synthetisiert, und seine Ablagerung in der EZM ist ein Zeichen für chronische Schäden und nicht für Regeneration [135], [139]. Allerdings enthält die Basallamina der Leber auch Komponenten, die untypisch für eine Basallamina sind wie Collagen I und Fibronectin [135]. Daher stellt sich die Frage, ob die Hepatozyten in Sandwichkultur Fibronectin synthetisieren, um die Zusammensetzung der künstlichen EZM an ihre Bedürfnisse anzupassen, sich in einem entzündungsähnlichen Zustand befinden oder Fibroblasten-typische Eigenschaften gewonnen haben. Die EMT kann nicht nur durch Wachstumsfaktoren wie TGF- β induziert werden [140], auch die Aktivierung von $\alpha_2\beta_1$ -Integrinen durch Collagen ist ausreichend, um eine von Wachstumsfaktoren unabhängige EMT zu bewirken [141]. Die spindelähnliche Form und die ovalen Kerne der Zellen sowie die Bildung von Stressfasern und Zell-Zell-Kontakten im Randbereich (Abbildung 3.30 Tag 5 c) sind typische Fibroblasten-Charakteristika. Bei den Zellen in der Mitte zeigen die Morphologie, das Zytoskelett und die Polarität keine Veränderungen. Anders ist die Situation bei der Genexpression: Verglichen mit den Zellen am Rand ist in der Mitte die Expression von MMP-2, -9, -13 und Collagen-1 gleich hoch. Das spricht dafür, dass auch in diesen Zellen eine Transformation stattfindet. Die schwächere Expression von Vimentin, die stärkere Expression von albumin und die Morphologie in der Mitte des Wells zeigen aber, dass die Transformation in diesem Bereich weniger ausgeprägt ist. Weaver et al. haben gezeigt, dass die EZM und ihre Rezeptoren den Phänotyp von Brust-Epithelzellen beeinflussen können und so dominant auf den zellulären Phänotyp wirken [142]. Da in Sandwichkulturen die Collagenstruktur am Rand dichter erscheint als in der Mitte (siehe Abbildung 3.31 B), was eine unterschiedliche Aktivierung der Integrine im mittleren oder Randbereich ermöglichen kann, könnte die Ausprägung der Transformation in verschiedenen Bereichen eines Wells mit der Collagenbeschichtung zusammenhängen. Gleichzeitig lässt dies vermuten, dass die Veranlagung zur Transformation im zellulären Phänotyp der Hepatozyten in Kultur schon durch Veränderungen während der Isolierung aus der Leber vorgegeben ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die in Monolayerkulturen beobachtete Transformation für Seneszenz spricht, während die leichte Veränderung der Zellen in der Sandwichkultur Merkmale eines *Scattering* zeigt. Im folgenden Kapitel wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Isolierung und Transformation besteht.

3.7 Isolierung

Loyer et al. haben gezeigt, dass während der Isolierung der Hepatozyten aus der Leber ein Übergang von der G₀- zur G₁-Phase („priming“ der Hepatozyten) stattfindet, wobei der Auslöser der Collagenaseverdau ist. Sie unterteilen das G₁-Stadium in die unmittelbar frühe („immediate-early“), die frühe („early“) und die mittlere („mid“) Phase. Danach folgt der Restriktionspunkt, der erst nach der Stimulation mit Mitogenen überschritten wird. Als Folge wird Cyclin D1 sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene aktiviert [143].

Um zu klären, ob dies auch in den untersuchten Kulturen der Fall ist bzw. um einen Zusammenhang zwischen diesem Übergang und der Stärke der Ausprägung der Transformation herstellen zu können, wurden folgende verschiedene (nicht stimulierte) Kulturen auf Genebene vergleichend charakterisiert: Eine Suspension (Zellen frisch nach dem Collagenaseverdau), die Kultur SW8 und die mit den Zellen derselben Maus angesetzte Monolayerkultur ML5 sowie die 3 Sandwichkulturen, deren RNA für die Mikroarrayanalysen verwendet wurden (SW5-7). Als Marker für verschiedene Stadien des Übergangs von G₀ zu G₁ wurden folgende von Loyer et al. untersuchten Gene ausgewählt: c-Fos als unmittelbar-frühes Gen, c-Myc als Marker für die frühe G₁-Phase, p53 für die mittlere G₁-Phase und Cyclin D1 für die Überschreitung des G₁-Restriktionspunkts. Gleichzeitig wurde auch die Expression der Transformationsmarker betrachtet.

* *

Die Ergebnisse der PCR sind in Abbildung 3.32 dargestellt. C-Fos wird, wie erwartet, schon in den Suspensionszellen exprimiert. Beim Vergleich einer Monolayer- und einer Sandwichkultur mit Zellen aus der gleichen

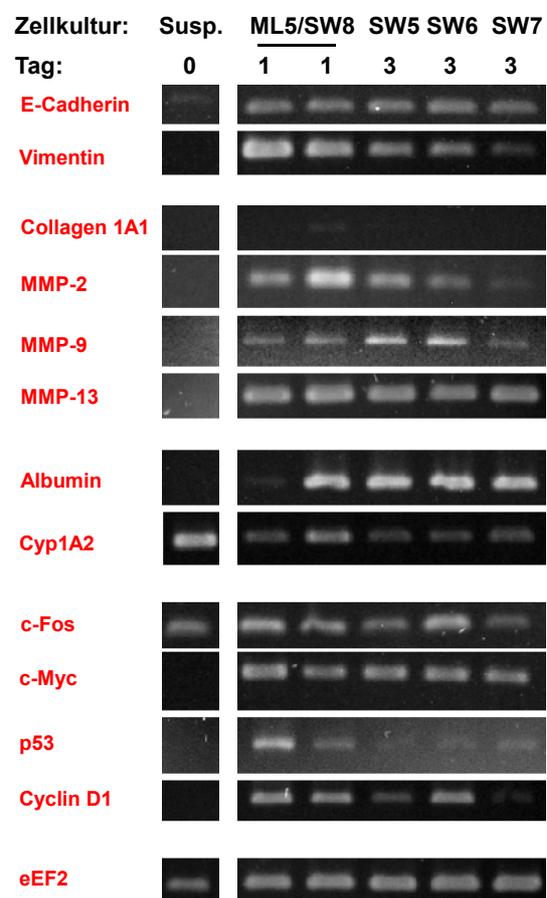


Abbildung 3.32: Vergleich der Genexpression in verschiedenen Kulturen. (PCR).

Isolation (ML5 und SW8) zeigt sich, dass in ML5 die Expression von c-Fos, c-Myc und Cyclin D1 leicht, die von p53 deutlich höher ist als in SW8. Auch die Transformation ist hier stärker ausgeprägt (Vimentin) und die spezifische Aktivität deutlich geringer (Albumin Cyp1A2). Der Kulturtyp hat also einen Einfluss darauf, wie sich die Folgen der Isolierung auf

die Zellen auswirken.

Die Aktivierung der unmittelbar-frühen Gene nach der Isolierung („priming“) erinnert an Regeneration, allerdings findet in den untersuchten Sandwichkulturen keine Mitose statt, und auch der für Hepatozyten natürliche Zustand (G_0) wird nicht wieder erreicht. Die Hochregulation von c-Fos nach der Isolierung, sowie die spätere Aktivierung von c-Myc, p53 und Cyclin D1 sind Indizien dafür, dass die Hepatozyten das G_1 -Stadium durchlaufen. Allerdings bleiben dabei c-Fos und c-Myc bis zum Tag 3 aktiviert, obwohl sie normalerweise nur transient aktiv sind (siehe [143]). Es ist bekannt, dass die Überexpression von c-Fos eine EMT oder eine Dedifferenzierung von Epithelzellen einleiten kann, die mit einer Inhibierung der Proliferation und Aktivierung der Apoptose verbunden ist [61]. Reichmann et al. haben gezeigt, dass in Brust-Epithelzellen die kurzfristige Aktivierung von c-Fos einen reversiblen Polaritätsverlust induziert, während eine langzeitige Aktivierung dazu führt, dass die Zellen ihre Polarität irreversibel verlieren und eine epithelial-fibroblastoide Transformation beginnen ([144]). Ähnliche Merkmale zeigen in unterschiedlichem Maße die in dieser Arbeit beobachteten Sandwichkulturen: c-Fos ist durchgängig aktiv, Anzeichen von Transformation sind vorhanden, Apoptose ist aktiviert und kann nur durch Zell-Zell-Kontakte umgangen werden (siehe auch Kapitel 3.1.3). Die als Indikatoren für den Übergang G_0 - G_1 benutzten Gene (c-Fos, c-Myc, p53 und Cyclin D1) sind in SW7 am geringsten exprimiert, und gleichzeitig zeigt diese Kultur die schwächsten Anzeichen einer Transformation (Expression von Vimentin, MMP-2 und MMP-9). Die gleichen Indikatoren sind bei SW5 etwas schwächer ausgeprägt als bei SW8, und auch die Transformation ist hier weniger deutlich, während in Monolayerkultur sowohl die Marker für den G_0 - G_1 -Übergang als auch die Transformation am stärksten ausgeprägt sind.

Diese Beobachtungen sowie der Vergleich zwischen Monolayer- und Sandwichkultur weisen darauf hin, dass eine höhere Expression von c-fos, c-myc und p53 nach der Isolierung eine deutlicher ausgeprägte Transformation verursacht, wobei sich in der Sandwichkultur diese Veränderungen nach der Isolierung schwächer auswirken als in Monolayerkultur.

3.8 Abschließender Vergleich

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kultursystem für polarisierte primäre murine Hepatozyten für Signaltransduktionsanalysen etabliert und vergleichend mit der Monolayerkultur charakterisiert. Für einen abschließenden Vergleich wurden die Kulturen an verschiedenen Tagen einzeln betrachtet und die Eigenschaften in Tabelle 3.1 festgehalten. Anschließend wurden anhand der Tabelle und der Ergebnisse der einzelnen Kapitel die Monolayer- und die Sandwichkultur zusammenfassend charakterisiert:

Monolayerkultur (Abbildung 3.33

A)

- Die Polarität wird schneller reetabliert, geht aber auch schnell wieder verloren.
- Die konstitutive Aktivierung von Akt und ERK könnte auf die Kontakte zwischen Zellen und EZM, die auf einer Monolayerbeschichtung von Anfang an möglich sind, zurückzuführen sein. Die Bildung von Fokalkontakten kann auch die von IL-6 unabhängige Phosphorylierung von STAT3 erklären.

- Eine deutliche Antwort auf IL-6 (Phosphorylierung von STAT3, aber keine sichtbaren Veränderungen in der Aktivierung von ERK) ist nur am Tag 1 sichtbar, schon am Tag 3 reagiert die Kultur nicht mehr auf Stimulation und die meisten Proteine sind konstitutiv aktiviert
- Die hepatische Aktivität ist sehr gering
- Nachbarlose Zellen können durch Integrine Zell-EZM-Kontakte bilden und sind so trotz fehlender AJ vor Anoikis geschützt; β -Catenin zeigt bei diesen Zellen eine zytoplasmatische Lokalisierung
- Die Dedifferenzierung ist am Rand stärker ausgeprägt; dedifferenzierte Zellen zeigen Seneszenz-Merkmale (hohe Expression von p53, abgeflachte Form, Polinuklearität, fehlende Proteinsynthese)

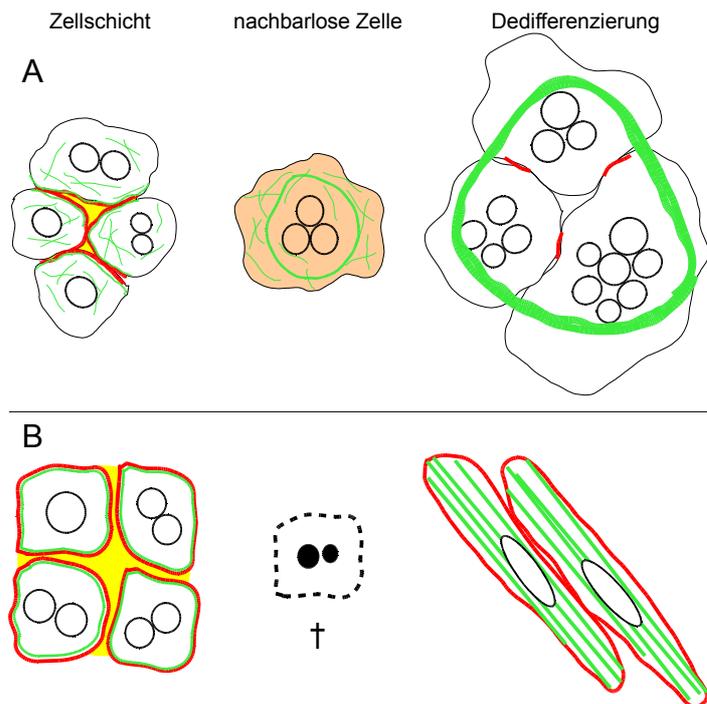


Abbildung 3.33: **Schematische Darstellung der Zellen** (A): Monolayerkultur; (B): Sandwichkultur. β -Catenin (rot), Actin (grün), Gallenkanälchen (gelb).

Insgesamt ist die Monolayerkultur instabil, verändert sich bzw. altert schnell, ihre Reaktivität auf Stimulationen ist begrenzt, und die spezifische Funktion der Hepatozyten ist sehr schwach.

Sandwichkultur (Abbildung 3.33 B)

- Die Polarität ist gut (in einigen Kulturen sehr gut) ausgebildet; die Gallenkanälchen sind funktionsfähig, allerdings haben sie keinen Ausgang, wodurch sich sekretierte toxische Stoffwechselprodukte in ihnen sammeln können. Das könnte mit der Zeit zur Vergiftung der Zellen führen.
- Die Zellen können keine Kontakte mit dem Collagen der Sandwichbeschichtung eingehen, möglicherweise wird deswegen keine konstitutive Aktivierung von ERK und STAT3 beobachtet
- Die Antwort auf IL-6 (Phosphorylierung von STAT3 und ERK1/2) ist auch am Tag 5 der Kultivierung eindeutig, in guten Kulturen werden auch Cyclin D1 und Cyclin E1 von IL-6 aktiviert. Auf Genebene werden durch IL-6 unmittelbar-frühe- sowie Zellzyklus-Gene reguliert.
- Die Expression von Albumin ist sehr hoch, aber das Cyp1A2-Niveau sinkt mit der Zeit.
- Nachbarlose Zellen sterben, da sie weder Zell-Zell- noch Zell-Matrix-Kontakte bilden können.
- Die Dedifferenzierung ist am Rand stärker ausgeprägt, allerdings ist keine Seneszenz, sondern eher EMT oder *Scattering* (Streckung der Zellen, lange Stressfasern, die Collagenschichten werden abgebaut und Fibronectin wird synthetisiert) zu beobachten. Außerdem weisen die Stressfasern auf Bildung von Fokalkontakten hin, was wiederum Integrinbindungen voraussetzt. Die Zellen bilden diese Integrinverbindungen also möglicherweise mit dem selbstsynthetisiertem Fibronectin. Anzeichen einer Transformation sind auch im mittleren Bereich der Wells vorhanden, trotz unveränderter Morphologie und Zytoskelettorganisation.

Für die Sandwichkultur lässt sich zusammenfassen, dass sie zeitlich stabiler als die Monolayerkultur ist und sich nur langsam verändert. Sie behält ihre deutliche Reaktivität auf IL-6 über mehrere Tage aufrecht, und die leberspezifischen Funktionen werden in dieser Zeit nur teilweise schwächer. Daher stellt sie eine bessere *in vitro*-Kultur für Hepatozyten dar und ist auch für Analysen von Signalwegen geeignet.

Parameter	Prozess/ Struktur	ML Tag 1		ML Tag 3		ML Tag 6/7		SW Tag 1	SW Tag 3	SW Tag 5/6		SW Tag 5 (nur Genexpression)	
		Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand			Mitte	Rand	Mitte	Rand
Morphologie	Trans- formation	rechteckig	ausgebreitet	rechteckig	ausgebreitet	ausgebreitet	Fusion	rechteckig	rechteckig	rechteckig	gestreckt		
Vimentin (G/P)		ja/nein		>Tag 1/ja		>Tag 3		wenig/nein	>Tag 1/nein	>Tag 3/nein		ja	ja, > Mitte
Cadherin (G/P)								ja/>Tag0	ja/>Tag 0; <Tag1	ja/nein		ja	ja, = Mitte
Kerne		rund		rund	mehrkernig	rund	oval, mehrkernig	rund	rund	rund	oval		
Actin-Strukturen	Fokal- kontakte	Ringe, kurze Faser		Ringe, kurze Faser		große Ringe		Membran, leicht zytoplasmatisch	Membran	Membran, zytoplasmatisch	lange Faser		
konst. Expr. ERK		ja		ja					nein				
B-Catenin/E-Cadherin	AJ	Membran	Zytoplasma, wenig Membran	Zytoplasma		Zytoplasma		Membran	Membran, selten Zytoplasma	Membran, auch Zytoplasma	Membran		
ZO-1	Polarität	kleine GK	überall	überall				Membran	lange GK	lange GK, auch Zellen ohne ZO-1	Keine oder ausgestreckte GK		
Gallenkanälchen		klein	nein	wenig, klein		kaum		Kaum ?	lange GK	lange GK			
konst. Expr. STAT3		etwas		viel		allgemein keine Proteine		nein	nein	nein			
Cyclin D1		nein		ja, konstitutiv					Nein oder nur nach IL-6				
Profil STAT3													
Matrixsynthese (G/P)	Matrix- Remodelling	nein/sehr wenig		wenig/>Tag 1		> Tag 3/nein		sehr wenig/sehr wenig	>ML T3/>T1, >ML	>ML T5/>T3		-	-
MMPs (G/P)		sehr wenig/nein		sehr wenig/wenig		> Tag 3/nein		wenig, >ML/nein	wenig/wenig, > ML	viel/viel		ja	ja, = Mitte
Albumin (G/P)	Hepatische Funktion	<<SW/wenig		-/wenig				viel/viel	viel/viel	viel/viel		ja	ja, < Mitte
Cyp1A2 (G/P)		-/wenig		-/nein				ja/wenig	weniger/nein	weniger/nein		ja	ja, = Mitte
α2M (G/P)		-/nein		-/nein				-/ja	-/ja				
Apoptose				manchmal, Gruppen				selten, einzelne Zellen	selten, einzelne Zellen				

Tabelle 3.1: Übersichtscharakterisierung der Kulturen. Abkürzungen und Notationen: GK – Gallenkanälchen; (G/P) – auf Gen-/Proteinebene; Konst. Expr. – Konstitutive Expression; Z-Z-K – Zell-Zell-Kontakte; Strich (-) in der Tabelle bedeutet nicht untersucht.

Da die Leber ein sehr komplexes System darstellt, ist es kaum denkbar, ein einfaches Kultursystem zu entwickeln, das voll funktionsfähige Zellen enthält und gleichzeitig Standardmethoden wie Immunfärbung, Gen- und Proteinanalysen ermöglicht. Trotz allmählicher Transformation und Abnahme der hepatischen Funktionen kommt die Sandwichkultur in allen betrachteten Aspekten dem *in-vivo*-Zustand näher als die Monolayerkultur. Allerdings können Sandwichkulturen aus verschiedenen Isolierungen sehr unterschiedlich sein, wobei die sehr gut polarisierten und/oder wenig transformierten eine Minderheit darstellen. Daher wäre es wünschenswert, die Kultivierung von Hepatozyten von der Isolierung an zu optimieren, um eine Reproduzierbarkeit zu erreichen und die Qualität der Kultur zu verbessern.

4 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine Kultur für polarisierte murine Hepatozyten zu etablieren, in der molekulargenetische und proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt werden können. Diese Kultur soll im Projekt „Endosys“ verwendet werden, um Mechanismen der Endozytoseregulation in polarisierten Hepatozyten zu untersuchen. Die neu etablierte Kultur und die konventionelle Monolayerkultur sollten bezüglich der Morphologie, Polarität, und Reaktion nach der Stimulation mit Interleukin-6 vergleichend charakterisiert werden. Dazu wurden zunächst Protokolle für RNA- und Proteinextraktion sowie Immunfärbung in der Sandwichkultur etabliert. Bei der RNA- und Proteinextraktion hat sich die nichtenzymatische Entfernung der Collagenschichten vor der Lyse der Zellen als notwendig und ausreichend erwiesen, um vom Protokoll unverfälschte Ergebnisse zu erhalten. Die von der oberen Collagenschicht herrührende Beeinträchtigung der Immunfärbung, die sich mit der Zeit vermindert, lieferte das erste Indiz dafür, dass die Zellen in der Sandwichkultur ihre extrazelluläre Matrix verändern. Um die Antwort auf IL-6 auf Proteinebene besser vergleichen zu können, wurde zuerst das semiquantitative Western-Blot-Verfahren weiterentwickelt und eine hyperbolische Regression für die Eichreihe verwendet. Die Aktivierung verschiedener Proteine nach der Stimulation mit IL-6 wurde in beiden Kulturen analysiert, in der Sandwichkultur zusätzlich die Genexpression. So zeigt die Sandwichkultur auch am Tag 5 noch eine deutliche Reaktion auf der IL-6-Stimulation, während in der Monolayerkultur schon am Tag 3 eine konstitutive Expression aller untersuchten Proteine und dadurch eine sehr schwache Antwort auf IL-6 beobachtet wurde. Dies ging einher mit Dedifferenzierung und Polaritätsverlust. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Kerntransport von P-STAT3 (Tyr 705), sondern bereits die Phosphorylierung von STAT3 nach IL-6-Stimulation ohne Endozytose nicht stattfindet. Alle in dieser Arbeit betrachteten Sandwichkulturen bildeten längere und mehr Gallenkanälchen und zeigten gleichzeitig eine deutlichere Antwort auf IL-6 (z.B. Phosphorylierung von STAT3) als die Monolayerkulturen. Bei einzelnen Sandwichkulturen mit einem besonders gut entwickelten Netzwerk aus Gallenkanälchen konnte nach der IL-6-Behandlung auch die Aktivierung von Cyclin D1 nachgewiesen werden. Trotzdem wurden auch in der Sandwichkultur leichte Anzeichen einer Transformation beobachtet. Im Gegensatz zur Monolayerkultur, bei der es sich um Seneszenz handelt, liegt in der Sandwichkultur vermutlich EMT oder *Scattering* vor, und die Transformation setzt deutlich später ein. PCR-Ergebnisse zeigen eine Vimentin-Expression in der Sandwichkultur auch in Zellen, die keine morphologischen und strukturellen Veränderungen aufweisen, daher kann die Sandwichkultur

verwendet werden, um vom Umbau des Zytoskeletts unabhängige Veränderungen während der Transformation zu untersuchen.

Obwohl die Sandwichkultur die Struktur und Funktion der Leber keinesfalls vollständig wiedergeben kann, konnte in der vorliegenden Arbeit eine Kultur für murine Hepatozyten etabliert werden, die auch für Untersuchungen von Signalwegen geeignet ist.

Literaturverzeichnis

- 1: Oztan A, Silvis M, Weisz OA, Bradbury NA, Hsu SC, Goldenring JR, Yeaman C, Apodaca G, **Exocyst requirement for endocytic traffic directed toward the apical and basolateral poles of polarized MDCK cells**, *Mol Biol Cell*. 2007, 18 (10): 3978-3992
- 2: Ihrke G, Neufeld EB, Meads T, Shanks MR, Cassio D, Laurent M, Schroer TA, Pagano RE, Hubbard AL, **WIF-B Cells: An In Vitro Model for Studies of Hepatocyte Polarity**, *J Cell Biol*. 1993, 123 (6): 1761-1775
- 3: Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE, **Molekulare Zellbiologie**, 2001, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, ISBN: 3-8274-1077-0
- 4: Dunn JCY, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG, **Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration**, *FASEB* 1989, 3: 174-177
- 5: Schmidt RF, Lang F, Thews G, **Physiologie des Menschen**, 2005, *Springer Medizin Verlag*, ISBN: 3-540-21882-3
- 6: Sasse D, Spornitz UM, Maly IP, **Liver architecture**, *Enzyme* 1992, 46: 8-32
- 7: Drenckkhahn D, Zenker W, **Benninghoff Anatomie**, 1994, *Urban & Schwarzenberg*, ISBN: 3-541-00245-X
- 8: Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, **Zukunftstechnologie Tissue Engineering**, 2003, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA*, ISBN:
- 9: Peng X, Grosse B, Le Tiec B, Nicolas V, Delagebeaudeuf C, Bedda T, Decaens C, Cassio D, **How to induce non-polarized cells of hepatic origin to express typical hepatocyte polarity: generation of new highly polarized cell models with developed and functional bile canaliculi**, *Cell Tissue Res* 2006, 323: 233-243
- 10: Simons K, Fuller SD, **Cell Surface Polarity in Epithelia**, *Ann. Rev. Cell Biol.* 1985, 1: 243-288
- 11: Bazzoni G, Dejana E, **Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis**, *Physiol Rev* 2004, 84: 869-901
- 12: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, **Molecular Biology of the Cell**, 2008, *Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC*, ISBN: 0-8153-4106-7
- 13: Niessen CM, **Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function**, *J. Invest. Dermatol.* 2007, 127 (11): 2525-2532
- 14: Arias AM, **Epithelial Mesenchymal Interactions in Cancer and Development**, *Cell* 2001, 105: 425-431
- 15: Kelleher FC, Fennelly D, Rafferty M, **Common critical pathways in embryogenesis**

- and cancer**, *Acta Oncologica* 2006, 45: 375-388
- 16: Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA, **Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia**, *The Journal of Cell Biology* 1986, 103: 755-766
- 17: Pitot HC, Sirica AE, **Methodology and utility of primary cultures of hepatocytes from experimental animals**, *Methods Cell Biol.* 1980, 21B: 441-456
- 18: Bissell DM, Guzelian PS, **Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture**, *Ann N Y Acad Sci.* 1980, 349: 85-98
- 19: Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ, **Isolated Hepatocytes**, 1991, *Elsevier*, ISBN:
- 20: Bissell DM, Arenson DM, Maher JJ, Roll FJ, **Support of Cultured Hepatocytes by a Laminin-rich Gel**, *J. Clin. Invest* 1987, 79: 801-812
- 21: Jefferson DM, Clayton DF, Darnell. JR. JE, Reid LM, **Posttranscriptional Modulation of Gene Expression in Cultured Rat Hepatocytes**, *Mol Cell Biol.* 1984, 4 (9): 1929-1934
- 22: Enat R, Jefferson DM, Ruiz-Opazo N, Gatmaitan Z, Leinwand LA, Reid LM, **Hepatocyte proliferation in vitro: Its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix**, *PNAS* 1984, 81: 1411-1415
- 23: Wanson JC, Drochmans P, Mosselmans R, Ronveaux MF, **Adult Rat Hepatocytes in Primary Monolayer Culture**, *The Journal of Cell Biology* 1977, 74: 858-877
- 24: Klingmüller U, Bauer A, Bohl S, Nickel PJ, Breitkopf K, Dooley S, Zellmer S, Kern C, Merfort I, Sparna T, Donauer J, Walz G, Geyer M, Kreutz C, Hermes M, Götschel F, Hecht A, Walter D, Egger L, Neubert K, Borner C, Brulport M, Schormann W, Sauer C, Baumann F, Preiss Rm MacNelly S, Godoy P, Wiercinska E, Ciuculan L, Edelmann J, Zeilinger K, Heinrich M, Zanger UM, Gebhardt T, Maiwald T, Heinrich R, Timmer J, von Weizsäcker F, Hengstler JG, **Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways**, *IEE Proc.-Syst. Biol.* 2006, 153 (6): 433-447
- 25: Dunn JCY, Tompkins RG, Yarmush ML, **Long-Term in Vitro Function of Adult Hepatocytes in a Collagen Sandwich Configuration**, *Biotechnol.Prog.* 1991, 7: 237-245
- 26: Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML, **Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration**, *FASEB* 1996, 10: 1471-1487
- 27: Dunn JCY, Tompkins RG, Yarmush ML, **Hepatocytes in Collagen Sandwich: Evidence for Transcriptional and Translational Regulation**, *The Journal of Cell Biology* 1992,

- 116: 1043-1053
- 28: Bader A, Zech K, Crome O, Christians U, Ringe B, Pichlmayr R, Sewing KF, **Use of organotypical cultures of primary hepatocytes to analyse drug biotransformation in man and animals**, *Xenobiotica* 1994, 24 (7): 623-633
- 29: Kemp DC, Brouwer KLR, **Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure**, *Toxicol In Vitro* 2004, 18: 869-877
- 30: Treijtel N, van Helvoort H, Barendregt A, Blaauboer BJ, van Eijkeren JCH, **The use of sandwich-cultured rat hepatocytes to determine the intrinsic clearance of compounds with different extraction ratios: 7-ethoxycoumarin and warfarin**, *Drug Metabolism and Disposition* 2005, 33 (9): 1325-1332
- 31: Turncliff RZ, Tian X, Brouwer KLR, **Effect of culture conditions on the expression and function of Bsep, Mrp2, and Mdr1a/b in sandwich-cultured rat hepatocytes**, *Biochemical Pharmacology* 2006, 71: 1520-1529
- 32: Tuschl G, Mueller SO, **Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes - Cell morphology and differential gene expression**, *Toxicology* 2006, 218: 205-215
- 33: Bader A, Frühauf N, Tiedge M, Drinkgern M, De Bartolo L, Borlak JT, Steinhoff G, Haverich A, **Enhanced Oxygen Delivery Reverses Anaerobic Metabolic States in Prolonged Sandwich Rat Hepatocyte Culture**, *Experimental Cell Research* 1999, 246: 221-232
- 34: LeCluyse EL, Fix JA, Audus KL, Hochman JH, **Regeneration and Maintenance of Bile Canalicular Networks in Collagen-sandwiched Hepatocytes**, *Toxicology in Vitro* 2000, 14: 117-132
- 35: Schmitmeier S, Langsch A, Jasmund I, Bader A, **Development and characterization of a small-scale bioreactor based on a bioartificial hepatic culture model for predictive pharmacological in vitro screenings**, *Biotechnol Bioeng.* 2006, 95 (6): 1198-1206
- 36: Miaczynska M, Zerial M, **Mosaic Organization of the Endocytic Pathway**, *Experimental Cell Research* 2002, 272: 8-14
- 37: Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M, **Not just a sink: endosomes in control of signal transduction**, *Current Opinion in Cell Biology* 2004, 16: 400-406
- 38: Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L, **Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway**, *Biochem. J* 1998, 334: 297-314
- 39: Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F, **Principles of IL-6-type cytokine signalling and its regulation**, *Biochem J* 2003, 374: 1-20

-
- 40: Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R, **STATs in oncogenesis**, *Oncogene* 2000, 19: 2474-2488
- 41: Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A, **STAT Proteins: From Normal Control of Cellular Events to Tumorigenesis**, *J Cell Physiol* 2003, 197: 157-168
- 42: Greenhalgh CH, Hilton DJ, **Negative regulation of cytokine signaling**, *J. Leukoc Biol.* 2001, 70 (3): 348-356
- 43: Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA, **The JAK/STAT signaling pathway**, *J Cell Sci.* 2004, 117 (Pt 8): 1281-1283
- 44: Bild AH, Turkson J, Jove R, **Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis**, *EMBO* 2002, 21 (13): 3255-3263
- 45: Shah M, Patel K, Mukhopadhyay S, Xu F, Guo G, Sehgal PB, **Membrane-associated STAT3 and PY-STAT3 in the cytoplasm**, *J Biol Chem.* 2006, 281 (11): 7302-7308
- 46: Alvarez A and Frank DA, **Genome-wide analysis of STAT target genes: elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis**, *Cancer Biol Ther* 2004, 3 (11): 1045-1050
- 47: Taub R, **Liver Regeneration: From Myth to Mechanism**, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5: 836-847
- 48: Rozga J, **Hepatocyte proliferation in health and liver failure**, *Med Sci Monit* 2002, 8 (2): RA32-38
- 49: Trautwein C, Böker K, Manns MP, **Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms**, *Gut* 1994, 35: 1163-1166
- 50: Gao B, **Cytokines, STATs and Liver Disease**, *Cell Mol Immunol.* 2005, 2 (2): 92-100
- 51: Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Ogino T, Irani K, Ozaki M, **Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms**, *J Clin Invest.* 2003, 112 (7): 989-998
- 52: Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R, **Interleukin-6 Protects against Fas-mediated Death by Establishing a Critical Level of Anti-apoptotic Hepatic Proteins FLIP, Bcl-2 and Bcl-xL**, *J Biol Chem.* 2001, 276 (28): 26605-26613
- 53: Taub R, **Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway**, *J Clin Invest.* 2003, 112 (7): 978-980
- 54: Inoue H, Ogawa W, Ozaki M, Haga S, Matsumoto M, Furukawa K, Hashimoto N, Kido Y, Mori T, Sakaue H, Teshigawara K, Jin S, Iguchi H, Hiramatsu R, LeRoith D, Takeda

- K, Akira S, Kasuga M, **Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo**, *Nat Med.* 2004, 10 (2): 168-174
- 55: Hirano T, Ishihara K, Hibi M, **Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors**, *Oncogene* 2000, 19: 2548-2556
- 56: Levy DE, Lee C-K, **What does Stat3 do?**, *J Clin Invest.* 2002, 109 (9): 1143-1148
- 57: Sun R, Jaruga B, Kulkarni S, Sun H, Gao B, **IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: Regulation by SOCS3**, *BBRC* 2005, 338: 1943-1949
- 58: Paul C, Seiliez I, Thissen JP, Le Cam A, **Regulation of expression of the rat SOCS-3 gene in hepatocytes by growth hormone, interleukin-6 and glucocorticoids**, *Eur J Biochem* 2000, 267: 5849-5857
- 59: Acloque H, Thiery JP and Nieto MA, **The physiology and pathology of the EMT**, *EMBO Reports* 2008, 9 (4): 322-326
- 60: Boyer B, Valles AM, Edme N, **Induction and Regulation of Epithelial-Mesenchymal transitions**, *Biochemical Pharmacology* 2000, 60: 1091-1099
- 61: Eger A, Mikulits W, **Models of epithelial-mesenchymal transition**, *Drug Discovery Today: Disease Models* 2005, 2 (1): 57-63
- 62: Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H and Grünert S, **Ras and Tgf beta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways**, *J Cell Biol.* 2002, 156 (2): 299-313
- 63: van Marck VL and Bracke ME, **Epithelial-Mesenchymal Transitions in Human Cancer in Rise and Fall of Epithelial Phenotype: Concepts of Epithelial-Mesenchymal Transition**, 2005, *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, ISBN: 0-306-48239-8
- 64: De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C, **Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas**, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95: 8847-8851
- 65: Le TL et al, **Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics**, *J Cell Biol* 1999, 146 (1): 219-232
- 66: Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W, **Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis**, *Mutation Research* 2004, 566: 9-20
- 67: Yumoto R, Nishikawa H, Okamoto M, Katayama H, Nagai J, Takano M, **Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-**

- 6TN, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, 290: L946-L955
- 68: Barth CA, Schwarz LR, **Transcellular transport of fluorescein in hepatocyte monolayers: Evidence for functional polarity of cells in culture**, *PNAS* 1982, 79: 4985-4987
- 69: Rozen S, Skaletsky HJ, **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**, *Methods Mol Biol.* 2000, 132: 365-386
- 70: Tatusova T, Madden TL, **BLAST 2 SEQUENCES, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences**, *FEMS Microbiology Letters* 1999, 174: 247-250
- 71: Clerk A, Sugden PH, **Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-Jun transcription factors in rat ventricular myocytes**, *Biochem. J.* 1997, 325: 801-810
- 72: Haan S, Keller JF, Behrmann I, Heinrich PC, Haan C, **Multiple reasons for an inefficient STAT1 response upon IL-6-type cytokine stimulation**, *Cell Signal.* 2005, 17: 1542-1550
- 73: Heidebrecht F, Heidebrecht A, Schulz I, Behrens SE, Bader A, **Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range**, *J Immunol Methods.* 2009, 345: 40-48
- 74: Nahmias Y, Kramvis Y, Barbe L, Casali M, Berthiaume F, Yarmush M, **A novel formulation of oxygen-carrying matrix enhances liver-specific function of cultured hepatocytes**, *FASEB J* 2006, 20 (14): E1829-E1836
- 75: Bartles JR, Hubbard AL, **Preservation of hepatocyte plasma membrane domains during cell division in situ in regenerating rat liver**, *Dev Biol.* 1986, 118: 286-295
- 76: Decaens C, Cassio D, **Spatiotemporal expression of catenins, ZO-1, and occludin during early polarization of hepatic WIF-B9 cells**, *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 49: C527-C539
- 77: Wang L, Boyer JL, **The Maintenance and Generation of Membrane Polarity in Hepatocytes**, *Hepatology* 2004, 39 (4): 892-899
- 78: Miyoshi J, Takai Y, **Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57: 815-855
- 79: Theard D, Steiner M, Kalicharan D, Hoekstra D, van Ijzendoorn SCD, **Cell Polarity Development and Protein Trafficking in Hepatocytes Lacking E-Cadherin/ β -Catenin-based Adherens Junctions**, *Mol Biol Cell.* 2007, 18: 2313-2321
- 80: Bender V, Büschlen S, Cassio D, **Expression and localization of hepatocyte domain-specific plasma membrane proteins in hepatoma x fibroblast hybrids and in hepatoma dedifferentiated variants**, *J Cell Sci.* 1998, 111: 3437-3450
- 81: Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG, **Evidence that fibroblasts**

- derive from epithelium during tissue fibrosis**, *J. Clin. Invest.* 2002, 110: 341-350
- 82: Gupta S, **Hepatic polyploidy and liver growth control**, *Semin Cancer Biol.* 2000, 10 (3): 161-171
- 83: Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard DR, Reid LM, Gupta S, **Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events**, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999, 276: 1260-1272
- 84: Toyoda H, Bregerie O, Vallet A, Nalpas B, Pivert G, Brechot C, Desdouets C, **Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis**, *Gut* 2005, 54: 297-302
- 85: Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C, **Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes**, *J Biol Chem.* 2003, 278 (21): 19095-19101
- 86: Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR, **Roads to polyploidy: the megakaryocyte example**, *J Cell Physiol.* 2002, 190 (1): 7-20
- 87: Hayashi S, Fujii E, Kato A, Kimura K, Mizoguchi K, Suzuki M, Sugimoto T, Takanashi H, Itoh Z, Omura S, Wanibuchi H, **Characterization of Multinuclear Hepatocytes Induced in Rats by Mitemcinal (GM-611), an Erythromycin Derivative**, *Toxicol Pathol.* 2008, 36 (6): 858-865
- 88: Micchelli ST, Thomas D, Boitnott JK, Torbenson M, **Hepatic giant cells in hepatitis C virus (HCV) mono-infection and HCV/HIV co-infection**, *J Clin Pathol.* 2008, 61 (9): 1058-1061
- 89: Koukoulis G, Mieli-Vergani G, Portmann B, **Infantile liver giant cells: immunohistological study of their proliferative state and possible mechanisms of formation**, *Pediatr Dev Pathol.* 1999, 2 (4): 353-359
- 90: Nakamura T, Yoshimoto K, Nakayama Y, Tomita Y, Ichihara A, **Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell-cell contact and cell membranes**, *PNAS* 1983, 80: 7229-7233
- 91: Kundu AK, Nagaoka M, Chowdhury EH, Hirose S, Sasagawa T, Akaike T, **IGF-1 induces growth, survival and morphological change of primary hepatocytes on a galactose-bared polymer through both MAPK and beta-catenin pathways**, *Cell Struct Funct.* 2003, 28 (4): 255-263
- 92: Guren TK, Abrahamsen H, Thoresen GH, Babaie E, Berg T, Christoffersen T, **EGF-Induced Activation of Stat1, Stat3 and Stat5b Is Unrelated to the Stimulation of DNA Synthesis in Cultured Hepatocytes**, *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 258

- (3): 565-571
- 93: Chen E, Kwon YT, Lim MS, Dube ID and Hough MR, **Loss of Ubr1 promotes aneuploidy and accelerates B-cell lymphomagenesis in TLX1/HOX11-transgenic mice**, *Oncogene* 2006, 25: 5725-5763
- 94: Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ, **Down-regulation of claudin-2 in breast is associated with advanced disease**, *Histopathology* 2008, 53 (1): 48-55
- 95: Roman-Blas JA, Stokes DG and Jimenez SA, **Modulation of TGF- β signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes**, *Osteoarthritis and Cartilage* 2007, 15: 1367-1377
- 96: Chen J, Guerriero E, Lathrop K and SundarRaj N, **Rho/ROCK Signaling in Regulation of Corneal Epithelial Cell Cycle Progression**, *IOVS* 2008, 49 (1): 175-183
- 97: Schilling M, Maiwald T, Bohl S, Kollmann M, Kreutz C, Timmer J, Klingmüller U, **Computational processing and error reduction strategies for standardized quantitative data in biological networks**, *FEBS J.* 2005, 272: 6400-6411
- 98: Blomberg J and Klasse PJ, **Quantification of immunoglobulin on electrophoretic immunoblot strips as a tool for human immunodeficiency virus serodiagnosis**, *J Clin Microbiol.* 1988, 26 (1): 111-115
- 99: Studnika GM, **Hyperbolic regression analysis for kinetics, electrophoresis, ELISA, RIA, Bradford, Lowry, and other applications**, *CABIOS* 1987, 3 (1): 9-16
- 100: Braitbard O, Glickstein H, Bishara-Shieban J, Pace U, Stein WD, **Competition between bound and free peptides in an ELISA-based procedure that assays peptides derived from protein digests**, *Proteome Science* 2006, 4 (12):
- 101: O'Connor T and Gosling JP, **The dependence of radioimmunoassay detection limits on antibody affinity**, *J Immunol Methods.* 1997, 208: 181-189
- 102: Ekins R, Newman B, **Theoretical aspects of saturation analysis**, *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 1970, 147: 11-36
- 103: Holland T, Holland H, **A mathematical model of immunohistochemical preparations, which provides quantitative predictions**, *J Microsc.* 2003, 214: 1-6
- 104: Michaelis L, Menten ML, **Die Kinetik der Invertinwirkung**, *Biochem. Z* 1913, 49: 339-369
- 105: Dunn JCY, Tompkins RG, Yarmush ML, **Hepatocytes in Collagen Sandwich: Evidence for Transcriptional and Translational Regulation**, *J Cell Biol.* 1992, 116: 1043-1053
- 106: Suzuki M, Ichikawa K, Sakoda A, Sakai Y, **Long-term culture of primary rat hepatocytes with high albumin secretion using membrane-supported collagen**

- sandwich**, *Cytotechnology* 1993, 11: 213-218
- 107: Kienhuis AS, Wortelboer HM, Maas WJ, van Herwijen M, Kleinjans JCS, van Delft JHM, Stierum RH, **A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling**, *Toxicol In Vitro* 2007, 21: 892-901
- 108: Heidebrecht F, Schulz I, Keller M, Behrens SE, Bader A, **Improved Protocols for Protein and RNA Isolation from 3D Collagen Sandwich Cultures of Primary Hepatocytes**, *Anal Biochem.* 2009, 393 (1): 141-144
- 109: Du Y, Han R, Wen F, Ng San San S, Xia L, Wohland T, Leo HL, Yu H, **Synthetic sandwich culture of 3D hepatocyte monolayer**, *Biomaterials* 2008, 29: 290-301
- 110: Farkas D, Bhat VB, Mandapati S, Wishnok JS, Tannenbaum SR, **Characterization of the Secreted Proteome of Rat Hepatocytes Cultured in Collagen Sandwiches**, *Chem. Res. Toxicol* 2005, 18: 1132-1139
- 111: Ramanujan S, Pluen A, McKee TD, Brown EB, Boucher Y, Jain RK, **Diffusion and Convection in Collagen Gels: Implications for Transport in the Tumor Interstitium**, *Biophys J.* 2002, 83: 1650-1660
- 112: Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T, **The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements**, *BMC Mol Biol.* 2006, 7: 3
- 113: Lock JG, Wehrle-Haller B, Strömblad S, **Cell-matrix adhesion complexes: Master control machinery of cell migration**, *Semin Cancer Biol.* 2008, 18: 65-76
- 114: Wallace K, Burt AD, Wright MC, **Liver fibrosis**, *Biochem. J* 2008, 411: 1-18
- 115: Friedman SL, **Hepatic fibrosis - Overview**, *Toxicology* 2008, 120-129: 120-129
- 116: Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R, **Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition**, *J Biol Chem.* 2007, 282 (32): 23337-23347
- 117: Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, **Stat3 as an Oncogene**, *Cell* 1999, 98 (6): 295-303
- 118: Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R, **Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2 and Bcl-xL**, *J Biol Chem.* 2001, 276 (28): 26605-26613
- 119: Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG, **Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin-6 administration**, *Hepatology* 2003, 38 (2): 326-334
- 120: Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R, **STAT3 Contributes to the Mitogenic**

- Response of Hepatocytes during Liver Regeneration**, *J Biol Chem* 2002, 277 (32): 28411-28417
- 121: Sherr CJ, **Mammalian G1 Cyclins**, *Cell* 1993, 73: 1059-1065
- 122: Parrado J, Bougria M, Ayala A, Castano A and Machado A, **Effects of aging on the various steps of protein synthesis: fragmentation of elongation factor 2**, *Free Radic Biol Med.* 1999, 26 (3-4): 362-370
- 123: Fassett JT, Tobolt D, Nelsen CJ, Albrecht JH, Hansen LK, **The Role of Collagen Structure in Mitogen Stimulation of ERK, Cyclin D1 Expression, and G1-S Progression in Rat Hepatocytes**, *J Biol Chem.* 2003, 278 (38): 31691-31700
- 124: Daley WP, Peters SB, Larsen M, **Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine**, *J Cell Sci.* 2008, 121: 255-264
- 125: Chiarugi P, Giannoni E, **Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells**, *Biochem Pharmacol.* 2008, 76: 1352-1364
- 126: Yamada KM, Geiger B, **Molecular interactions in cell adhesion complexes**, *Curr Opin Cell Biol.* 1997, 9 (1): 76-85
- 127: Debidda M, Wang L, Zang H, Poli V, Zheng Y, **A Role of STAT3 in Rho GTPase-regulated Cell Migration and Proliferation**, *J Biol Chem.* 2005, 280 (17): 17275-17285
- 128: Ogata H, Chinen T, Yoshida T, Kinjyo I, Takaesu G, Shiraishi H, Iida M, Kobayashi T, Yoshimura A, **Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production**, *Oncogene* 2006, 25: 2520-2530
- 129: Saile B, Ramadori G, **Inflammation, Damage Repair and Liver Fibrosis - Role of Cytokines and Different Cell Types**, *Z Gastroenterol* 2007, 45: 77-86
- 130: Tsareva S, Moriggl R, Corvinus FM, Wiederanders B, Schütz A, Kovacic B, Friedrich K, **Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation Promotes Invasive Growth of Colon Carcinomas through Matrix Metalloproteinase Induction**, *Neoplasia* 2007, 9 (4): 279-291
- 131: Gibson AE, Noel RJ, Herlihy JT, Ward WF, **Phenylarsine oxide inhibition of endocytosis: effects on asialofetuin internalization**, *Am J Physiol.* 1989, 257: 182-184
- 132: Li W, Liang W, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R, **Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy**, *Hepatology* 2001, 33 (6): 1377-1386
- 133: Hu XF, Li J, Vandervalk S, Wang Z, Magnuson NS, Xing PX, **PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis**, *J Clin Invest.* 2009, 119: 362-75

- 134: Fuji C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N, **Abberand expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines**, *Int. J. Cancer* 2004, 114: 209-218
- 135: Martinez-Hernandez A and Amenta PS, **The extracellular matrix in hepatic regeneration**, *FASEB J.* 1995, 9 (14): 1401-1410
- 136: Ezzell RM, Toner M, Hendricks K, Dunn JCY, Tompkins RG, Yarmush ML, **Effect of Collagen Gel Configuration on the Cytoskeleton in Cultured Rat Hepatocytes**, *Experimental Cell Research* 1993, 208: 442-452
- 137: Carnero A, **Cellular Senescence as a Target in Cancer Control**, *Current Cancer Therapy Reviews* 2007, 3: 7-15
- 138: Wilkinson RC and Dickson AJ, **Expression of CCAAT/enhancer binding protein family genes in monolayer and sandwich culture of hepatocytes: induction of stress-inducible GADD153**, *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 289 (5): 942-949
- 139: Hagiwara T, Suzuki H, Kono I, Kashiwagi H, Akiyama Y and Onozakitt K, **Regulation of Fibronectin Synthesis by Interleukin-1 and Interleukin-6 in Rat Hepatocytes**, *American Journal of Pathology* 1990, 136 (1): 39-47
- 140: Bissell DM, **Chronic liver injury, TGF- β , and cancer**, *Experimental and Molecular Medicine* 2001, 33 (4): 179-190
- 141: Tucker GC, Boyer B, Gavrilovic J, Emonard H, Thiery JP, **Collagen-mediated Dispersion of NBT-II Rat Bladder Carcinoma Cells**, *Cancer Research* 1990, 50: 129-137
- 142: Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C and Bissell MJ, **Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies**, *J Cell Biol.* 1997, 137 (1): 231-245
- 143: Loyer P, Cariou S, Glaise D, Bilodeau M, Baffet G, Guguen-Guillouzo C, **Growth Factor Dependence of Progression Through G1 and S Phases of Adult Rat Hepatocytes in Vitro**, *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271 (19): 11484-11492
- 144: Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M and Beug H, **Activation of an Inducible c-FosER Fusion Protein Causes Loss of Epithelial Polarity and Triggers Epithelial-Fibroblastoid Cell Conversion**, *Cell* 1992, 71: 1103-1116

Anhänge

Anhang A: Chemikalien, Materialien und Kits

A.1 Chemikalien

20× LumiGLO® Reagent and 20× Peroxide	New England Biolabs (Frankfurt a. Main)	7003
Agarose	Roth (Karlsruhe)	6352.4
Acrylamid	AppliChem (Darmstadt)	A3626
AmphiGreen Fluo	Biostep (Jahnsdorf)	LN03-K1035
APS	Bio-Rad Laboratories (München)	178388A
beta-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)	4227.1
Borsäure	Roth (Karlsruhe)	5935.1
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)	T116.1
BSA	PAA (Cölbe)	K45-001
CaCl ₂	Roth (Karlsruhe)	A119.1
Calcein AM	Biotrend (Köln)	80011-2
Collagen I	BD biosciences (Heidelberg)	354236
Collagenase IA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	C2674
DAPI	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	D9542
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	D9542
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	D2915
DMEM (10x)	Biochrom (Berlin)	F0435
DNA-Größenstandard	Fermentas (St. Leon-Rot)	SM0313
DTT	Roth (Karlsruhe)	6908.1
E64	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	E3132
EDTA	Fluka (St.Gallen)	3680
EGTA	Roth (Karlsruhe)	3054.3
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)	3738.2
Ethanol	Roth (Karlsruhe)	P076.2
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)	2218.1
Ethidium Homodimer I	Biotrend (Köln)	40014
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	F7378
Fötale Kälberserum	Gibco (Karlsruhe)	10270-106
Glucose	Merck (Darmstadt)	8346
Glutamin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	G8540
Glycerin	Roth (Karlsruhe)	7530.1
H ₂ SO ₄	Riedel-de Haën	30743
Hepes	Roth (Karlsruhe)	9105.3
ImperialTM Protein Stain	Pierce (Rockford, USA)	24615
Interleukin-6	Immunotools GmbH (Friesoythe)	11340060
Interleukin-6	Hözel Diagnostika (Köln)	11340064
K ₂ HPO ₄	Roth (Karlsruhe)	P749.1
KCl	Fluka (St.Gallen)	60130
KH ₂ PO ₄	Merck Darmstadt	4873
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	L2884
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)	T145.2

Milchpulver	Roth (Karlsruhe)	T145.2
MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)	M1701
Na ₂ CO ₃	Riedel-de Haën (Seelze)	31432
Na ₂ HPO ₄ ·x2H ₂ O	Roth (Karlsruhe)	4984.1
Na ₃ PO ₄ ·*12H ₂ O	Roth (Karlsruhe)	8613.1
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	S6508
NaCl	Roth (Karlsruhe)	3957.2
NaHCO ₃	Merck (Darmstadt)	6329
NaOH	Roth (Karlsruhe)	K021.1
Nonidet P40	Roche (Mannheim)	1754599
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega (Mannheim)	U1240
Oligo-dT-Primer	Promega (Mannheim)	C1101
Para-Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)	A146.3
PBS mit Ca und Mg	PAA (Cölbe)	H15-001
Penicillin/Streptomycin	PAA (Cölbe)	P11-010
Pentobarbital	Chemische Fabrik Berg (Bitterfeld)	10026
Phalloidin	Invitrogen (Karlsruhe)	O7466
Phenolrot	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P3532
Phenylarsinoxid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P3075
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P2850
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P5726
PMSF	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P7626
Ponceau S	Roth (Karlsruhe)	5938.2
Ponceau S	Roth (Karlsruhe)	5938.2
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P2714
Rekombinanter RNAsin	Promega (Mannheim)	N2511
Roti®-Histofix 10 %	Roth (Karlsruhe)	A146.3
SDS	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	L-6026
TEMED	Bio-Rad Laboratories (München)	1610800
Tris	Roth (Karlsruhe)	4855.2
Triton X	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	X-100
Trypanblau	Gibco (Karlsruhe)	15250-061
Tween 20	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P7949
Williams Medium E	Biochrom (Berlin)	F1115
Xylen-Cyanol	Roth (Karlsruhe)	A513.1

A.2 Materialien

Filterpapier	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	P8171-100EA
0,45 µm Nitrozellulose-Blotmembran	Biostep (Jahnsdorf)	MNC45
Teflonmembran 25 µm	Du Pont (Luxemburg)	FEP 100 C

A.3 Kits

Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche (Mannheim)	11 858 777 001
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)	74104
Taq DNA Polymerase (250 U)	Qiagen (Hilden)	201203
BCA Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, USA)	23227

Anhang B: Geräte

ELISA Reader Tecan Safire	Tecan (Genf, Schweiz)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop Olympus IX51	Olympus (Hamburg)
Geldokumentationssystem Fluorescence- und Chemiluminescence-Imaging-System	Bio-Rad Laboratories (München)
Geldokumentationssystem DH-30/32 mit UV-Transilluminator UXT-20M-15R	Biostep (Jahnsdorf)
NanoDrop-Spektrometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
PCR-Cycler MWG Biotech Primus 96 plus	MWG Biotech (Ebersberg)
Elektrophoresekammer TV 200	Biostep (Jahnsdorf)
Blotkammer Trans-blot SD cell	Bio-Rad Laboratories (München)

Anhang C: Medien, Puffer und Lösungen

C.1 Medien

Medium 1

- William's Medium E ergänzt mit:
 - 5% FCS
 - 100 nM Dexametason
 - 2 mM L-Glutamin
 - 1% Penicillin/Streptomycin

- 1% Penicillin/Streptomycin

10 x DMEM

- 10 g DMEM Pulver
- 44 M NaHCO₃
- mit Wasser auf 100ml auffüllen
- bei RT üN rühren lassen
- sterilfiltrieren

Medium 2

- William's Medium E ergänzt mit:
 - 100 nM Dexametason
 - 2 mM L-Glutamin
 - 1% Penicillin/Streptomycin

Isolationsmedium

- William's Medium E ergänzt mit:
 - 10% FCS;
 - 100 nM Dexametason;
 - 0,028 µM Glucagon;
 - 1,7 µM Insulin;
 - 2 mM L-Glutamin;
 - 1% Penicillin/Streptomycin

Medium 3

- William's Medium E ergänzt mit:
 - 2 mM L-Glutamin

C.2 Puffer

Hanks-Grundpuffer

- 137 mM NaCl;
- 5,36 mM KCl;
- 15 mM HEPES;
- 0,34mM Na₂HPO₄x2H₂O;
- 0,44 mM KH₂PO₄;
- pH 7,4

- 2,5 mM EGTA;
- 0,1% Glukose;
- 0,1% Penicillin/Streptomycin

Hanks-Puffer II (pro Maus):

- 50 ml HANKS-Grundpuffer;
- 5 mM CaCl₂;
- 0,3 mg/ml Collagenase (vor der Isolation

Hanks-Puffer I (pro Maus):

- 100 ml HANKS-Grundpuffer;

frisch
dazugegeben)

Kern-Grundpuffer

- 20 mM Hepes pH 7.9,
- 420 mM NaCl
- 1.5 mM MgCl₂
- 0,2 mM EDTA
- 25% (v/v) Glycerol

Kernpuffer

- *Kern-Grundpuffer* ergänzt mit:
 - 0,3 mM Na₃VO₄;
 - 200 µM Leupeptin;
 - 10 µM E-64;
 - 5mM DTT;
 - 300 µM PMSF

Ladepuffer für Nukleinsäuren (5x)

- 200 mM EDTA
- 50% Glycerin
- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylencyanol
- pH 8,0

Ladepuffer für Proteine

- 60 mM Tris pH 6.8
- 25% glycerol
- 5% β-mercaptoethanol
- 2% SDS
- 0.1% bromphenol blue

Lyse-Grundpuffer für Proteine

- 25 mM Tris
- 150 mM NaCl
- pH 7,2

Lysepuffer für Proteine

- *Lyse-Grundpuffer für Proteine* ergänzt mit:
 - 1:40 Protease Inhibitor Cocktail
 - jeweils 1:100 Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2

PBS (10x)

- 2,67 mM KCl
- 1,47 mM KH₂PO₄
- 137,93 mM NaCl
- 8,098 mM Na₂HPO₄

Puffer A+B

- 1,37 M NaCl
- 53,65 mM KCl
- 7,1 mM MgSO₄ x 7H₂O
- 3,31 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 4,41 mM KH₂PO₄

Puffer C

- 1,18 M NaCl
- 48,3 mM KCl
- 10,3 mM MgSO₄ x 7H₂O
- 25,4 mM CaCl₂ x 2H₂O
- 9,55 KH₂PO₄

SDS-Laufpuffer (10x)

- 0,25 M Tris (30,285g/l)
- 1,92 M Glycin (144g/l)
- 1% SDS (10g/l electrophoresis-grade SDS)

Strip-Puffer

- 200 mM Glycin
- 0,1% SDS
- 1% Tween-20
- pH 2,2

TBE-Puffer (10x)

- 0,89M Tris
- 0,89M Borsäure
- 0,02M EDTA
- pH 8,3

TBS (10x)

- 200 mM Tris base
- 1,37 M NaCl
- pH 7,6

TBST

- 1 x TBS
- 0,1% Tween-20

Transferpuffer

- 39 mM Glycin (2,9g/l)
- 48 mM Tris (5,8g/l)

- 20% MeOH (200ml/l)

- 1,37 mM SDS (0,395g/l)

Tris-Puffer pH 6,8 (4x)

- 0,5M Tris-Cl
- 0,4% SDS
- pH 6,8

Tris-Puffer pH 8,8 (4x)

- 1,5 M Tris-Cl
- 0,4% SDS
- pH 8,8

Zytoplasma-Grundpuffer

- 10 mM Hepes pH 7.9,
- 1.5 mM MgCl₂,
- 10 mM KCl

Zytoplasmapuffer

- *Zytoplasma-Grundpuffer* ergänzt mit:
 - 0,3 mM Na₃VO₄;
 - 200 µM Leupeptin;
 - 10 µM E-64;
 - 5 mM DTT;
 - 300 µM PMSF

C.3 Lösungen**Annexin V-Färbelösung**

- 1:50 Annexin-V-Fluos-Lösung (Kit)
- 1:50 Propidiumiodid-Lösung (Kit)
- in *Medium 3*

Antikörperlösung für Immunfärbung

- 0,15% Triton X in 1 x PBS

APS

- 10% APS in Wasser

Blocklösung

- 5 % Milchpulver in TBST

DAPI

- 1 µg/ml in Antikörperlösung für Immunfärbung

DEPC-Wasser

- 1 ml DEPC in 1l Wasser
- über Nacht kräftig rühren
- anschließend DEPC durch autoklavieren zerstören

dNTP-Mix

- je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in DEPC-Wasser

DTT-Lösung

- 12,5 mM DTT

ECL-Lösung

- 1:20 20x LumiGLO® Reagent;
- 1:20 20x Peroxide 1:20 in Wasser

Entfärbelösung für *Amphi Green Fluo*

- 0,2 M Tris
- 50 mM EDTA

Essigsäure

- 0,02N Essigsäure in Wasser

FDA-Stammlösung

- 0,1 mg/ml FDA in Aceton

Trenngellösung:

TRENNGEL				
	15%	12%	10%	8%
dH ₂ O	3ml	4,2ml	5ml	5,8ml
Acrylamid 30%	6ml	4,8ml	4ml	3,2ml
Tris-Puffer für Trenngel (4x)	3ml	3ml	3ml	3ml
APS	120µl	120µl	120µl	120µl
TEMED	12µl	12µl	12µl	12µl

Ladungsgellösung:

LADUNGSGEL	
	6%
dH ₂ O	2,7ml
Acrylamid 30%	1ml
Tris-Puffer für Ladungsgel (4x)	1,25ml
APS	50µl
TEMED	5µl

IL-6-Stammlösung

- 5 µg/ml in 5% BSA

Lösung A (pro Maus)

- 25 ml Puffer A+B;
- 200 ml Wasser;
- 0,5 mM NaHCO₃;
- 26,04 mM EGTA;
- mit Wasser auf 250ml auffüllen (pH 7,4)

Lösung B (pro Maus):

- 5 ml Puffer A+B;
- 36,6 ml Wasser;
- 12 mM NaHCO₃;
- 26,07 mM CaCl₂×2 H₂O;
- mit Wasser auf 50ml auffüllen (pH 7,4)

Lösung C (pro Maus):

- 12 ml Puffer C;
- 96 ml Wasser;
- 23,81 mM NaHCO₃;

- 4,95 mM Glucose \times H₂O; PBS-G
- mit Wasser auf 120ml auffüllen (pH 7,4)

PBS-G**Mounting-Lösung**

- 90% Glycerol in Wasser

- 5 mM D-Glucose

- 0,5% DMSO

- in PBS mit Ca und Mg

NaCl

- 5M NaCl in DEPC-Wasser

PFA-Lösung

- 3,7% Para-Formaldehyd in Wasser

PAO-Stammlösung (0,3mM, 0,5mg/ml)

- 50 mg/ml in DMSO

Ponceau S

- 0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure

PAO-Arbeitslösung

- 1:100 von der PAO-Stammlösung in

Anhang D: Antikörper

Antikörper gerichtet gegen	Firma	Bestellnummer	Wirt	Verdünnung	Puffer	Anwendung
Primär-Antikörper						
AKT	Cell Signalling Technology	9272	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
P-AKT (Ser 473)	Cell Signalling Technology	9271	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
P-AKT (Thr 308)	Cell Signalling Technology	9275	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
Albumin	Bethyl	A90-134P	Ziege	1:10000	TBST + 5% Milcpulver	WB
BCLXL	Cell Signalling Technology	2764	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% Milcpulver	WB
Cyclin D1	Cell Signalling Technology	2922	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
DPPIV/CD26	R&D Systems	AF954	Ziege	1:12,5	tBST + 5% BSA	IF
E-Cadherin	Cell Signalling Technology	3195	Kaninchen	1:100	PBS + 0,15% Triton X	IF
				1:1000	TBST + 5% BSA	WB
ERK	Cell Signalling Technology	9102	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
P-ERK1/2 (Thr 202/ Tyr 204)	Cell Signalling Technology	9106	Maus	1:1000	TBST + 5% Milcpulver	WB
GAPDH	Cell Signalling Technology	2118	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
Histon H2A.Z	Cell Signalling Technology	2718	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
Histon H3	Cell Signalling Technology	9715	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
MMP-9	Cell Signalling Technology	2270	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
SOCS3	Cell Signalling Technology	2923	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
STAT3	Cell Signalling Technology	9139	Maus	1:400	PBS + 0,15% Triton X	IF
				1:1000	TBST + 5% Milcpulver	WB
P-STAT3 (Tyr 705)	Cell Signalling Technology	9145	Kaninchen	1:100	PBS + 0,15% Triton X	IF
				1:1000	TBST + 5% BSA	WB
P-STAT3 (Tyr 705)	Cell Signalling Technology	9131	Kaninchen	1:1000	TBST + 5% BSA	WB
P-STAT3 (Tyr 705)	Cell Signalling Technology	9138	Maus	1:1000	TBST + 5% Milcpulver	WB
P-STAT3 (Ser 727)	Cell Signalling Technology	9136	Maus	1:1000	TBST + 5% Milcpulver	WB
Vimentin	Abcam	ab8978	Maus	1:500	TBST + 5% Milcpulver	WB
ZO-1	Zymed Laboratories	61-7300	Kaninchen	1:100	PBS + 0,15% Triton X	IF

Antikörper gerichtet gegen	Firma	Bestellnummer	Wirt	Verdünnung	Puffer	Anwendung
α/β -Tubulin	Cell Signalling Technology	2148	Kaninchen	1:100	PBS + 0,15% Triton X	IF
α 2-Makroglobulin	GenWay	15-288-20008F	Huhn	1:500	TBST + 5% Milcpulver	WB
B-Actin	Sigma-Aldrich	A5316	Maus	1:5000	TBST	WB
β -Catenin	Cell Signalling Technology	9581	Kaninchen	1:100	PBS + 0,15% Triton X	IF
<i>Sekundär-Antikörper</i>						
Kaninchen Ig (Alexa Fluor 555-gekoppelt)	Molecular Probes	A21429	Ziege	1:500	PBS + 0,15% Triton X + DAPI	IF
Ziege Ig (Alexa Fluor 488-gekoppelt)	Molecular Probes	A11078	Kaninchen	1:500	PBS + 0,15% Triton X + DAPI	IF
Maus Ig (Alexa Fluor 488-gekoppelt)	Molecular Probes	A11029	Ziege	1:500	PBS + 0,15% Triton X + DAPI	IF
Rabbit IgG (HRP-gekoppelt)	Cell Signalling Technology	7074	Ziege	1:1000	TBST + 5% Milcpulver	WB
Maus IgG (HRP-gekoppelt)	Cell Signalling Technology	7076	Pferd	1:1000	TBST + 5% Milcpulver	WB
Huhn IgY (HRP-gekoppelt)	Jackson Immuno	303-035-003	Kaninchen	1:5000	TBST + 5% Milcpulver	WB

Anhang E: Primer für PCR

Gen		Primersequenz	Annealing- temperatur (°C)	Zyklenzahl
vimentin	fw	ACG CCA TCA ACA CTG AGT TC	60	20
	rv	GTG CCA GAG AAG CAT TGT CA		
E-cadherin	fw	TGC CAC CAG ATG ATG ATA CC	60	25
	rv	TCC GAC TCA GAG GAG TTC AG		
collagen-1A1	fw	AAG AGG CGA GAG AGG TTT CC	60	25
	rv	ATC ACC AGG TTC ACC TTT CG		
Mmp-2	fw	GCT CAT CGC AGA CTC CTG	60	35
	rv	TGC TTC ACA TCC TTC ACC TG		
Mmp-9	fw	GAA CTC ACA CGA CAT CTT CCA G	58	30
	rv	TCA ATT CTC AGA CGC CAC AC		
Mmp-13	fw	CCT TGA TGC CAT TAC CAG TC	60	35
	rv	TCA CAA TGC GAT TAC TCC AG		
Cyp-1A2	fw	CAC TAA CGG CAA GAG CAT GA	60	25
	rv	GCT CCT GGA CAG TTT TCT GC		
albumin	fw	AGG CGA CTA TCT CCA GCC AAA	60	17 oder 10
	rv	AGT TGG GGT TGA CAC CTG AG		
p21	fw	AGT GTG CCG TTG TCT CTT CG	62	20
	rv	TCT GCG CTT GGA GTG ATA GA		
cyclin D1	fw	TTG ACT GCC GAG AAG TTG TG	61	30
	rv	AGA CCA GCC TCT TCC TCC AC		
cyclin E1	fw	AAT GGA TGG TTC CGT TCG	60	23
	rv	TCA GTG GTG TTC TGG AGG TG		
C-fos	fw	CTG TCC GTC TCT AGT GCC AAC	63	30
	rv	CAA CGC AGA CTT CTC ATC TTC		
C-myc	fw	ATC CTG ACG ACG AGA CCT TC	63	25
	rv	GCC TCT TCT CCA CAG ACA CC		
p53	fw	CCA TCA TCA CAC TGG AAG ACT C	63	30
	rv	AAG GCT TGG AAG GCT CTA GG		
eef2	fw	GGA GCC TAT CTA TCT GGT GGA	60	20
	rv	GCA GCA TGT GGC AGT ATC AG		

Anhang F: Mikroarrays**F.1 Hybridisierung**

Service report

Microarray service report

Gene expression analysis of different murine RNA samples
using Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarrays

April 4, 2008

.....
Sabrina Schmitz
Research Scientist

.....
Bernhard Gerstmayer, PhD
Manager Genomics Services



1. Quality control (QC) of total RNA

Twelve vials containing human RNA samples were shipped to Miltenyi Biotec on dry ice. Table 1 shows the RNA samples, which were quality-checked via the Agilent 2100 Bioanalyzer platform (Agilent Technologies).

Sample no.	RNA	Miltenyi-ID
1	M1-0-KI	1
2	M2-0-KI	2
3	M3-0-KI	3
4	M1-20-KI	4
5	M2-20-KI	5
6	M3-20-KI	6
7	M1-0-PAO	7
8	M2-0-PAO	8
9	M3-0-PAO	9
10	M1-20-PAO	10
11	M2-20-PAO	11
12	M3-20-PAO	12

Table 1: List of RNA samples

The results of the Bioanalyzer run are visualized in a gel image and an electropherogram (fig. 1) using the Agilent 2100 Bioanalyzer expert software. In addition to this visual control, the software allows the generation of an RNA Integrity Number (RIN) to check integrity and overall quality of total RNA samples. The RIN value is calculated by a proprietary algorithm that takes several QC parameters into account, for example, 28S RNA/18S RNA peak area ratios and unexpected peaks in the 5S RNA region. A RIN number of 10 indicates high RNA quality, and a RIN number of 1 indicates low RNA quality. According to published data and our own experience, RNA with a RIN number >6 is of sufficient quality for gene expression profiling experiments (see also Fleige, S. *et al.* (2006) *Mol Aspects Med.* 27:126–139).

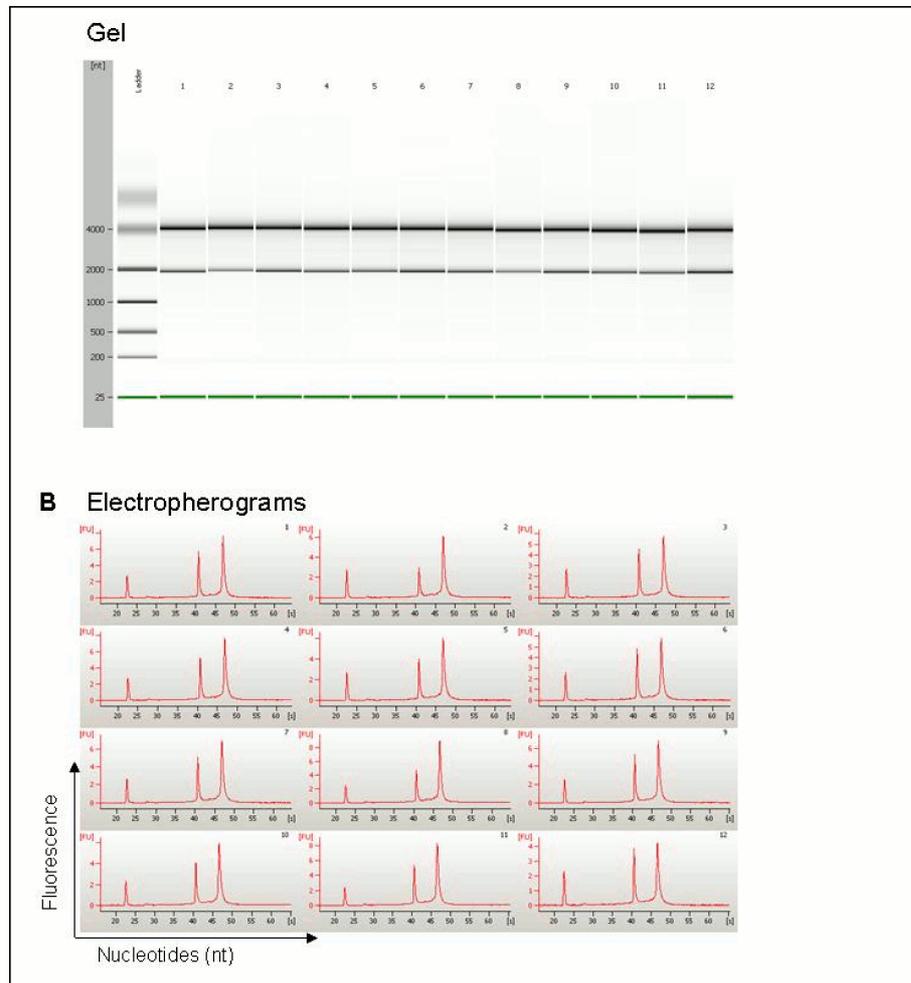


Figure 1: Gel image (A) and electropherogram (B) of total RNA samples. As a reference, the RNA molecular weight ladder (in nucleotides, nt) is shown in the first lane. The lowest migrating green band represents an internal standard. The two prominent peaks within the electropherograms represent ribosomal RNA: left 18S RNA, right 28S RNA. Scaling of the y-axis is done automatically, relative to the strongest signal within a single run.

Here, all RNA samples revealed RIN values between 9.5 and 10.0.



2. Linear T7-based amplification of RNA

For the linear T7-based amplification step, 0.5 µg of each total RNA sample was used. To produce Cy3-labeled cRNA, the RNA samples were amplified and labeled using the Agilent Low RNA Input Linear Amp Kit (Agilent Technologies) following the manufacturer's protocol. Yields of cRNA and the dye-incorporation rate were measured with the ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Sample	Labeling	cRNA (ng/µL)	Volume (µL)	Cy3 (pmol/µL)	Incorporation rate (fmol/ng)
1	Cy3	129.5	55	1.8	14
2	Cy3	156.7	55	2.3	15
3	Cy3	143.0	55	1.8	13
4	Cy3	158.7	55	2.1	13
5	Cy3	172.1	55	1.8	10
6	Cy3	169.7	55	2.4	14
7	Cy3	162.7	55	2.3	14
8	Cy3	179.4	55	2.7	15
9	Cy3	159.7	55	2.1	13
10	Cy3	128.4	55	1.7	13
11	Cy3	173.6	55	2.3	13
12	Cy3	140.1	55	1.5	11

Table 2: cRNA yield and dye-incorporation rate



3. Hybridization of Agilent Whole Genome Oligo Microarrays

The hybridization procedure was performed according to the Agilent 60-mer oligo microarray processing protocol using the Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies). Briefly, 1.65 µg Cy3-labeled fragmented cRNA in hybridization buffer was hybridized overnight (17 hours, 65 °C) to Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarrays 4x44K using Agilent's recommended hybridization chamber and oven.

Experiment no.	Cy3	Microarray no.
1	1	251486817676_1_1
2	2	251486817676_1_2
3	3	251486817676_1_3
4	4	251486817676_1_4
5	5	251486817677_1_1
6	6	251486817677_1_2
7	7	251486817677_1_3
8	8	251486817677_1_4
9	9	251486817678_1_1
10	10	251486817678_1_2
11	11	251486817678_1_3
12	12	251486817678_1_4

Table 3: Hybridization schedule

Finally, the microarrays were washed once with 6x SSPE buffer containing 0.005% N-lauroylsarcosine for 1 min at room temperature followed by a second wash with preheated 0.06x SSPE buffer (37 °C) containing 0.005% N-lauroylsarcosine for 1 min. The last washing step was performed with acetonitrile for 30 sec.



4. Scanning results

Fluorescence signals of the hybridized Agilent Microarrays were detected using Agilent's Microarray Scanner System (Agilent Technologies). All Cy3 images can be found on the provided CD-ROM.

5. Image and data analysis

The Agilent Feature Extraction Software (FES) was used to read out and process the microarray image files. The software determines feature intensities (including background subtraction), rejects outliers and calculates statistical confidences. For determination of differential gene expression FES derived output data files were further analyzed using the Rosetta Resolver[®] gene expression data analysis system (Rosetta Biosoftware). This software offers – among other features – the possibility to compare two single intensity profiles in a ratio experiment (table 4). All samples were labeled with Cy3, here, the ratio experiments are shown as control versus (vs.) sample experiments.

Ratio experiment no.	Intensity Profile control	Intensity Profile sample	Ratio experiment control vs. sample no.
1	4_5_6	1_2_3	4_5_6_vs_1_2_3
2	4	1	4_vs_1
3	5	2	5_vs_2
4	6	3	6_vs_3
5	7_8_9	1_2_3	7_8_9_vs_1_2_3
6	7	1	7_vs_1
7	8	2	8_vs_2
8	9	3	9_vs_3
9	10_11_12	1_2_3	10_11_12_vs_1_2_3
10	10	1	10_vs_1



11	11	2	11_vs_2
12	12	3	12_vs_3
13	10_11_12	7_8_9	10_11_12_vs_7_8_9
14	10	7	10_vs_7
15	11	8	11_vs_8
16	12	9	12_vs_9
17	4_5_6	10_11_12	4_5_6_vs_10_11_12
18	4	10	4_vs_10
19	5	11	5_vs_11
20	6	12	6_vs_12

Table 4: List of virtually created ratio experiments based on single intensity profiles



The results of the ratio experiments can be visualized in a double-log scatter plot. A representative double-log scatter plot for ratio experiment no. 1 is shown in figure 2; all scatter plots are provided on CD-ROM.

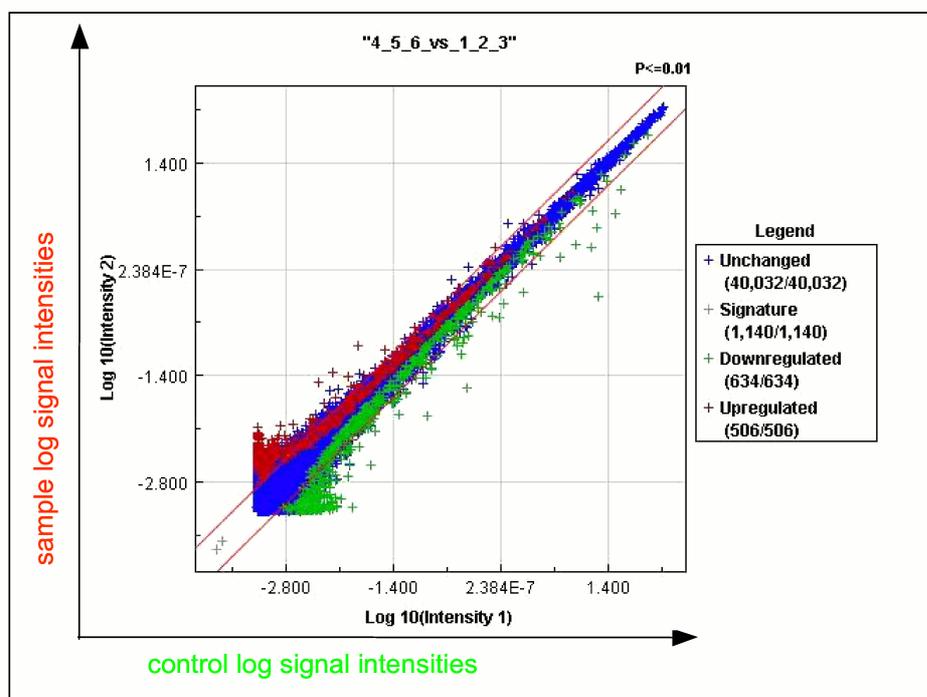


Figure 2: Scatter plot of signal intensities of all spots. As an example the data of one array experiment is shown (experiment no. 1). The signal intensities of each feature represented by a dot is shown in double logarithmic scale. X-axis: control-log signal intensity; y-axis: sample-log signal intensity. Red diagonal lines define the areas of 2-fold differential signal intensities. Blue cross: unchanged genes. Red cross: significantly upregulated genes (p -value < 0.01). Green cross: significantly downregulated genes (p -value < 0.01). Grey cross in legend: summary of significantly up- and downregulated signatures.



6. Gene lists

Single-experiment raw data list

Single-experiment normalized data list

Gene ratio list

Pre-selected candidate gene list

The output data of the Agilent Feature Extraction software includes gene lists with the complete raw data sets, referred to as single-experiment raw data list. The complete gene lists with all raw data are provided on CD-ROM.

Furthermore, the signal intensities from the single-experiment raw data lists are normalized by dividing the intensity values by their median. These normalized signal intensities are joined to a common table the single-experiment normalized data list. This list comprises in addition to the normalized intensity values the feature glsPosAndSignif which indicates with a value = 1 that the signal intensity is positive and significant above the background and a value = 0 that the signal intensity is not positive and significant above the background. The complete single-experiment normalized data list is enclosed on CD-ROM.

The Resolver[®] Software allows the export of a gene list with all normalized sample/control-log10 ratios and -fold changes, sequence descriptions, p-values, etc., referred to as gene ratio list (of all genes). The gene ratio lists for all ratio experiments are provided on CD-ROM. Putative candidate genes with a fold change >2 and p-value <0.01 are summarized in the pre-selected candidate gene list. An extract of such a list comprising some of the differentially expressed genes for ratio experiment no. 1 is shown in table 5. The complete pre-selected candidate gene lists for all experiments are enclosed on the provided CD-ROM.

Sequence ID	Sequence Name(s)	Sequence Description	Log(Ratio)	Fold Change	P-value
689089	Socs3	Mus musculus suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3), mRNA	-1.6463	-44.28967	0
683040	BC023202	Mus musculus 12 days embryo spinal cord cDNA, RIKEN full-length cDNA clone	-1.4192	-26.25439	0.00005
682316	Olfir1391	Mus musculus olfactory receptor 1391 (Olfir1391), mRNA [NM_179471.1]	-1.25399	-17.94711	0.00002
709732	V2r6	PREDICTED: Mus musculus vomeronasal 2, receptor, 6 (V2r6), mRNA	-1.24938	-17.7573	0.00004
707380	AK084662	Mus musculus 13 days embryo heart cDNA, RIKEN full-length cDNA clone	-1.23441	-17.15562	0.00005
703382	Fndc1	PREDICTED: Mus musculus fibronectin type III domain containing 1 (Fndc1), mRNA	-1.22483	-16.78135	0.00004
688157	Muc19	Mus musculus mucin 19 (Muc19), mRNA [NM_207243.1]	1.19685	15.73433	0.00002
691022	ENSMUST0000002	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library clone	1.19773	15.7663	0.00002
708183	Aoah	Mus musculus adult male colon cDNA, RIKEN full-length enriched library clone	1.20071	15.87473	0.00002
700833	Epha5	Mus musculus Eph receptor A5 (Epha5), mRNA [NM_007937.1]	1.20551	16.0512	0.00002
691238	LOC245600	PREDICTED: Mus musculus similar to transforming, acidic coiled-coil domain containing 1 (TACC1), mRNA	1.21175	16.28358	9.94E-06
706809	Ablim3	Mus musculus actin binding LIM protein family, member 3 (Ablim3), mRNA	1.22061	16.61901	0.00002
698625	1700092C02Rik	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library clone	1.23618	17.22586	0.00001
702887	4930549C01Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 4930549C01 gene (4930549C01Rik), mRNA	1.30007	19.95587	0.00001

Table 5: Excerpt of a pre-selected candidate gene list for ratio experiment no. 1

For further information please check also <http://www.miltenyibiotec.com> or contact us directly.



Unless otherwise specifically indicated, Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for therapeutic or diagnostic use.

MACS is a registered trademark of Miltenyi Biotec GmbH.
NanoDrop is a trademark of NanoDrop Technologies, Inc.
Agilent is a registered trademark of Agilent Technologies, Inc.
Microsoft and Excel are registered trademarks of Microsoft Corp.
Rosetta is a registered trademark of Rosetta Inpharmatics LLC.

© 2008 Miltenyi Biotec GmbH.

F.2 Bioinformatische Auswertung

Service report

Bioinformatics service report

Gene expression analysis of different murine RNA samples
using Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarrays

April 29, 2008

.....
Corinna Scholz, PhD
Senior Scientist Bioinformatics

.....
Kay Hofmann, PhD
Head of Bioinformatics



2. Remark on the Agilent platform and data analysis

The Agilent microarrays are built using the design elements “*Features*”, “*Reporters*”, and “*Sequences*”. The physically spotted probes on the arrays are the so-called *Features*. Some *Features* are spotted in replicates; identical *Features* are summarized to *Reporters* (figure 1).

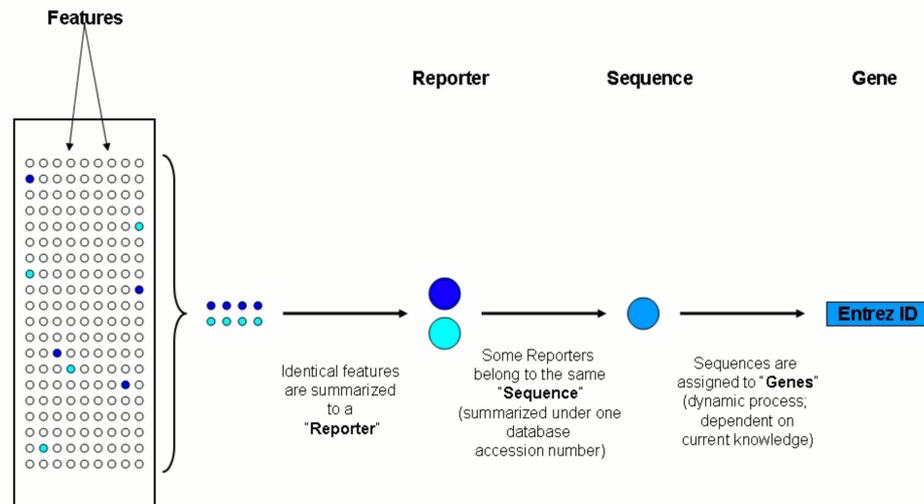


Figure 1: Sketch of the structure of an Agilent Microarray. *Features* are the physically spotted probes. The bioinformatical analysis is usually done on *Reporter*-level (summarized *Features*) or *Sequence*-level (summarized *Reporters*).

Reporters may be directed against different locations on the same transcript and thus share the same database identifier. These *Reporters* are then combined to *Sequences*. *Sequences* can be assigned to *Genes* in a dynamic process which is dependent on the growing knowledge about genes and genomes.

In the current dataset, the analysis was done on the *Reporter* level. This may cause some redundancy on the level of associated sequence names but is in statistical sense more accurate than combining the *Reporters* to *Sequences* right at the beginning of the analysis.

Intensity-based microarray experiments can be combined to ratio experiments. Basically, the intensity-value of each *Reporter* from one experiment is divided by the corresponding value from the control experiment (“baseline”). In the current dataset, computed ratios were used as basis for the analysis.



3. Data pre-processing

From the single channel data, ratios were computed which were further processed as described below. The raw data of the computed ratios are contained in the folder "1_Raw_ratio_data" on the enclosed CD. The ratio datasets were used as basis for the subsequent analyses.

3.1. Computation of ratios

Ratios were computed using the RosettaResolver™ Software (Rosetta Inpharmatics). Using this software system has the advantage that due to the implemented universal error model not only the ratios are computed, but also an associated p-value, which is a measure of the reliability of the observed difference between the two samples.

For the computation of the ratios, the donor-specific control samples were used as references. The samples combined to ratios are listed in table 2. The MS-Excel file "ratios_all_genes.xls" in the folder "2_Pre-processing" on the CD lists the ratios of all samples for a better overview.

Ratio no.	Intensity Profile "sample"	Intensity Profile "control"	Ratio name
1	M1_IL6	M1_control	M1_IL6-vs-M1_control
2	M2_IL6	M2_control	M2_IL6-vs-M2_control
3	M3_IL6	M3_control	M3_IL6-vs-M3_control
4	M1_inhibitor	M1_control	M1_Inh-vs-M1_control
5	M2_inhibitor	M2_control	M2_Inh-vs-M2_control
6	M3_inhibitor	M3_control	M3_Inh-vs-M3_control
7	M1_IL6 + inhibitor	M1_control	M1_IL6 + Inh-vs-M1_control
8	M2_IL6 + inhibitor	M2_control	M2_IL6 + Inh-vs-M2_control
9	M3_IL6 + inhibitor	M3_control	M3_IL6 + Inh-vs-M3_control

Table 2: Computed ratios comparing the treated samples with the donor mouse matched reference.

3.2. Further data processing

All ratio data were transformed to logarithms to the base 2 (log₂ ratio). In addition, for each ratio the corresponding "fold-change" was computed for a more intuitive understanding of the expression changes. All computed data are contained in the MS-Excel file "ratios_all_genes.xls" in the folder "2_Pre-processing" on the CD.



4. Inter-experiment correlation analysis

As an initial step in the analysis, all unfiltered ratio data were compared in a correlation analysis. The obtained inter-experiment correlation coefficients are listed in the supplementary MS-Excel file “correlation.xls” which can be found in the folder “2_Pre-processing” on the enclosed CD. A graphical representation of the correlation values is shown in figure 2 (see also “correlation.png” on the CD). Positive correlation is indicated by shades of yellow (better correlation = more intensive color), while anti-correlation is indicated by shades of blue.

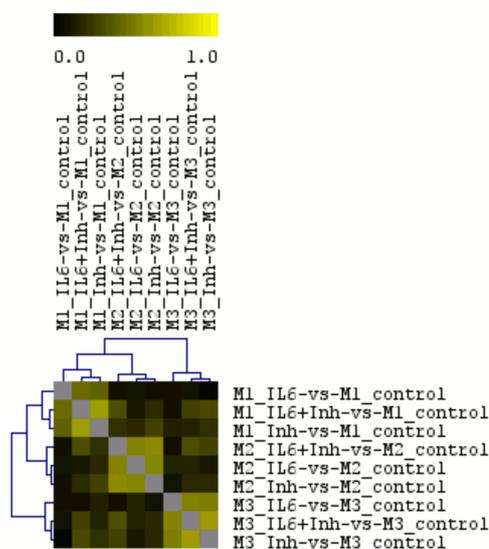


Figure 2: Inter-experiment correlation analysis of the unfiltered ratio dataset. The correlation matrix was clustered using Euclidean distance metric.

The overall correlation coefficients between the different arrays range from 0.027 between M3_Inh-vs-M3_control and M1_IL6-vs-M1_control to 0.624 in the comparison of M1_Inh-vs-M1_control and M1_IL6+Inh-vs-M1_control. Due to the animal-specific references used and also possibly due to a slight donor effect, the samples of the three animals form three distinct groups with mouse 3 forming the most distant group. The slight donor-effect is also visible (especially for mouse 3) when analyzing a ratio dataset with one common reference for all treated samples (data not shown). For mouse 1 and 3, the IL6 + inhibitor-treated samples show a closer correlation to the inhibitor-alone treated samples than to the IL6-alone treated samples.



5. Identification of genes responding the different treatments

Some genetic variability between the cell cultures studied is expected (according to the customer, the cell cultures show differences in terms of mortality and others) and thus, fluctuations in the gene expression levels of differentially regulated genes can be expected. Statistical analyses aiming at the detection of differentially regulated genes, however, are sensitive to variability in the treatment group – if the range of expression values covered within one experimental group is too large in comparison to the expression differences to the other experimental group in the statistical comparison, a gene may not be identified as differentially regulated. Due to these expected fluctuations in combination with a relatively low sample size ($N = 3$), no classical statistical method was used but the genes with consistent differential regulation after one of the treatments were identified by a simpler algorithm.

To be considered for the further analysis, a gene was required to be either positively or negatively regulated in all three donor mice with an associated p-value of 0.01 or below (i.e. the expression fold-change had to be either above 1 or below -1 in all three mice). The other genes, which did not meet this criterion, were removed from the dataset (i.e. the whole row with all expression values in it). These criteria were used to identify differentially regulated genes after treatment with IL6 alone, the inhibitor alone, and IL6 and the inhibitor combined. Table 3 lists the number of genes retained in the dataset after this step. A full list showing all of the genes is provided on the CD in the file “regulated_genes.xls” (see folder “3_Selected_genes”).

		Treatment		
		IL6	PAO	IL6 + PAO
No. reg. genes	total	142	409	705
	up	95	177	508
	down	47	232	197

Table 3: Number of genes differentially regulated in all three donor mice after the three different treatments.

Among the genes upregulated after treatment with IL6 are FOS, SOCS3, STAT1, STAT3, the CCAAT/enhancer binding protein CEBPD, CISH, IRF1, JUNB, MAP3K8, PIM1, and ZFP36. Of these genes, STAT1 is repressed by the inhibitor and more or less unregulated after the combined treatment of IL6 and the inhibitor.



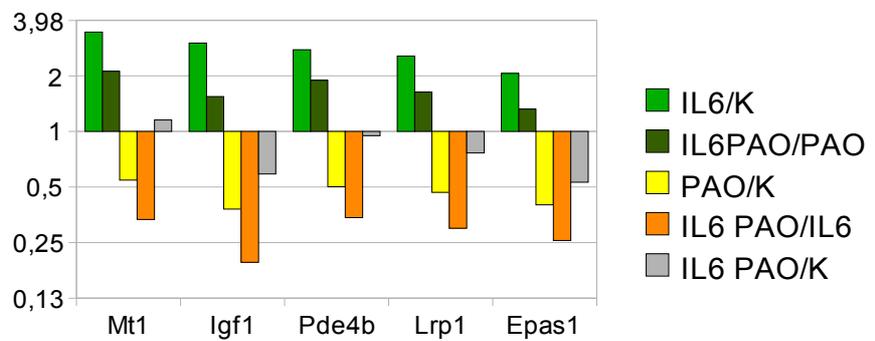
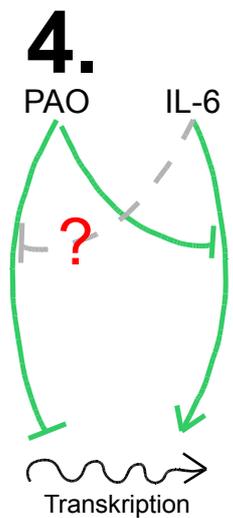
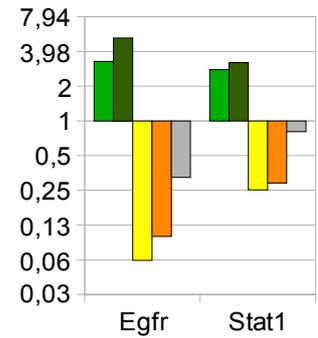
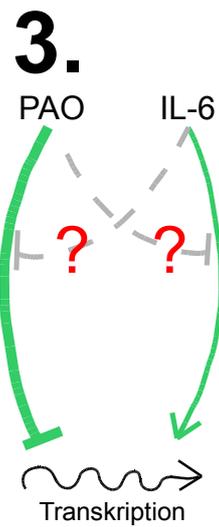
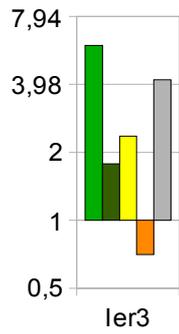
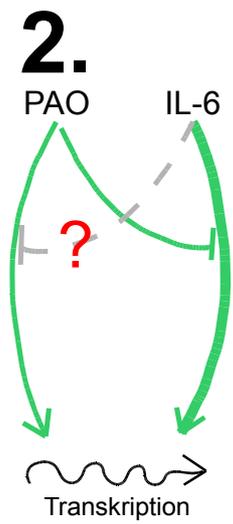
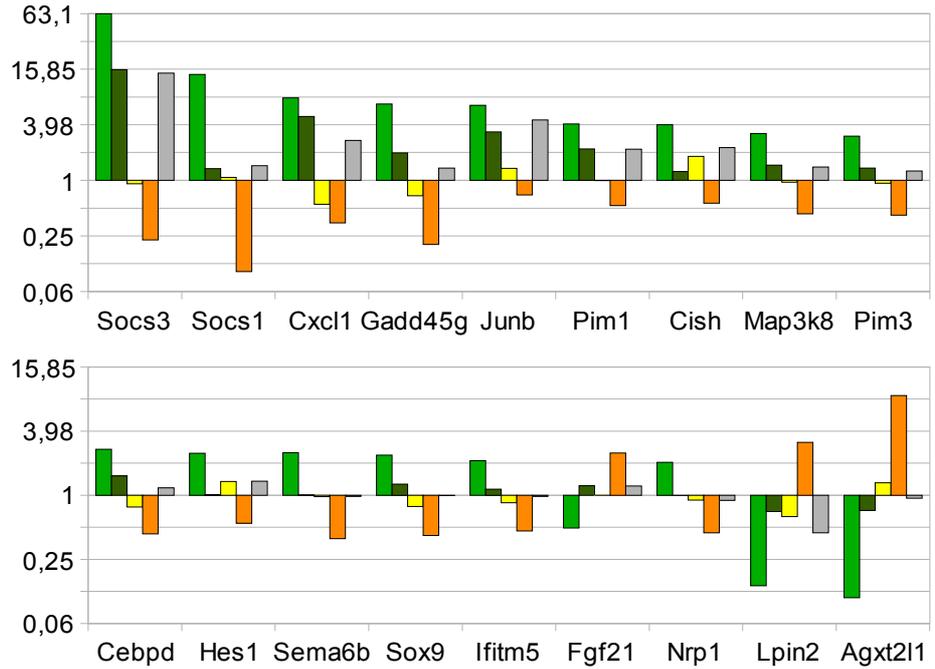
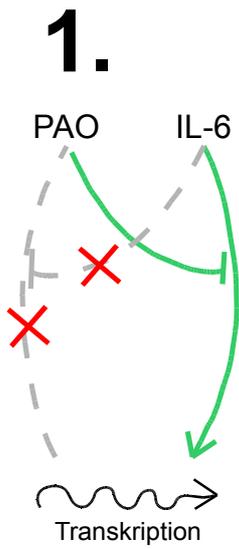
Unless otherwise specifically indicated, Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for therapeutic or diagnostic use.

MACS is a registered trademark of Miltenyi Biotec GmbH.
Agilent is a registered trademark of Agilent Technologies, Inc.
Rosetta Resolver is a registered trademark of Rosetta Inpharmatics LLC.
TreeRanker is a proprietary product of Miltenyi Biotec GmbH.
PathwayArchitect is a trademark of Stratagene Inc.
Microsoft and Excel are registered trademarks of Microsoft Corp.

© 2008 Miltenyi Biotec GmbH.

F.3 Regulierte Gene

Gen	fold-change								
	IL-6/Kontrolle			PAO/Kontrolle			IL-6 +PAO/Kontrolle		
	SW5	SW6	SW7	SW5	SW6	SW7	SW5	SW6	SW7
Socs3	62,801	47,115	31,110	-1,089	-1,630	-1,360	14,349	12,567	9,070
Socs1	13,935	9,902	18,760	1,078	1,060	-1,018	1,442	1,264	3,691
Cxcl1	7,781	7,349	3,323	-1,813	-1,588	-2,059	2,704	4,226	1,996
Gadd45g	6,671	8,095	12,711	-1,464	-1,555	1,190	1,354	1,874	2,531
Junb	6,479	6,349	5,655	1,347	-1,064	-1,309	4,499	4,321	4,544
Ier3	5,927	3,524	3,716	2,354	1,203	1,283	4,178	1,879	2,701
Egr1	5,631	4,003	4,745	3,729	1,611	2,281	6,407	4,269	6,674
Fos	4,757	1,859	3,261	8,269	1,360	2,940	19,372	3,075	7,301
Zfp36	4,303	3,684	4,599	2,141	1,011	1,554	4,311	3,021	4,007
Egr2	4,093	1,942	2,738	8,410	2,502	3,163	12,300	4,044	5,713
Pim1	4,072	4,789	4,439	-1,004	1,042	-1,028	2,174	2,807	2,231
Cish	3,980	2,473	1,939	1,808	1,240	1,247	2,253	1,667	-1,099
Zfp36	3,832	2,875	3,620	1,536	-1,249	2,006	4,777	3,476	5,042
Junb	3,661	3,079	3,951	1,039	-1,311	-1,125	2,703	2,437	3,515
Mt1	3,436	6,262	4,482	-1,832	-1,251	-1,651	1,153	2,971	1,426
Egfr	3,254	4,945	2,692	-15,987	-4,885	-5,487	-3,069	1,246	-1,616
Map3k8	3,216	2,286	2,474	-1,047	-1,193	-1,185	1,395	1,301	1,208
Pim3	2,998	3,578	3,534	-1,078	-1,292	1,037	1,258	1,362	1,594
Igf1	2,995	5,720	2,561	-2,622	-1,637	-1,492	-1,697	1,392	-1,279
Stat1	2,770	2,020	1,686	-3,937	-1,691	-3,011	-1,239	-1,042	1,121
Pde4b	2,768	2,254	2,401	-1,990	-1,572	-2,476	-1,052	-1,060	-1,317
Cebpd	2,695	2,644	2,842	-1,291	-1,269	-1,419	1,173	1,354	1,260
Lrp1	2,552	2,650	3,457	-2,132	-2,281	-1,361	-1,305	-1,083	1,334
Sema6b	2,492	2,177	2,090	-1,031	-1,103	1,049	-1,026	-1,018	1,444
Olf638	2,471	3,250	2,772	3,048	2,840	2,196	3,724	3,426	2,741
Hes1	2,467	1,745	2,008	1,343	1,097	1,085	1,353	1,124	2,025
Btg2	2,453	2,127	2,444	2,642	1,396	-1,029	2,876	1,854	1,819
Btg2	2,418	2,087	2,115	2,474	1,959	1,065	2,860	2,018	1,607
Sox9	2,365	1,722	2,122	-1,274	-1,463	-1,507	-1,005	-1,362	-1,201
Iitm5	2,107	2,433	2,983	-1,173	1,097	-1,072	-1,027	1,263	1,794
Btg2	2,103	2,442	2,210	2,743	2,341	1,027	2,781	2,225	1,454
Epas1	2,060	2,076	2,670	-2,485	-2,214	-3,544	-1,880	-1,064	-1,219
Mrpl52	2,058	2,124	2,183	-1,757	-1,168	-1,486	1,262	1,409	2,070
Nrp1	2,024	1,795	2,454	-1,113	-1,281	-1,704	-1,115	-1,085	1,286
Ak3	1,915	2,378	2,389	-1,076	-1,147	1,139	1,355	2,061	1,785
T2bp	1,827	2,011	2,762	1,096	1,282	1,169	1,276	1,558	1,838
Ncam1	1,597	2,454	2,608	3,155	2,322	1,918	2,197	2,153	1,824
Slc38a2	1,567	2,008	2,103	-1,199	-1,339	1,035	1,086	-1,101	1,268
AW476689	-1,502	-2,286	-2,018	-1,682	-1,904	1,687	1,062	1,455	1,655
Fgf21	-1,745	-2,614	-3,600	1,162	-1,337	1,262	1,267	-1,378	-1,412
Fgf21	-2,028	-2,865	-4,106	-1,002	-1,482	1,322	1,222	-1,432	-1,381
Fbp2	-2,108	-2,223	-1,600	-1,499	-2,223	-1,469	-1,314	-3,032	-3,584
Cyp2d22	-2,137	-2,301	-1,977	-2,333	-2,520	-2,158	-3,463	-2,239	-2,384
Snai2	-2,258	-2,048	-2,069	-1,783	-1,623	-1,300	-1,804	-1,695	-1,858
Terc	-2,282	-3,249	-1,977	-1,974	-2,432	-1,574	-1,931	-1,916	-1,502
Cyp1a1	-2,821	-3,589	-1,465	-3,058	-5,339	1,560	1,242	-4,879	1,367
Asxl3	-4,950	-11,527	9,922	-7,321	-12,840	2,050	-7,075	-13,333	1,046
Lpin2	-6,978	-6,296	-9,717	-2,076	-1,074	-1,244	-2,227	-1,660	-1,954
Lpin2	-7,036	-6,073	-4,857	-1,587	-1,086	-1,177	-2,250	-2,214	-2,003
Agxt2l1	-9,094	-4,377	-3,607	1,305	1,870	2,149	-1,065	1,524	1,268



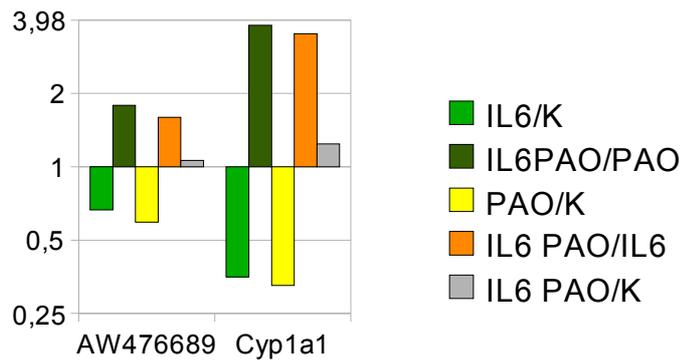
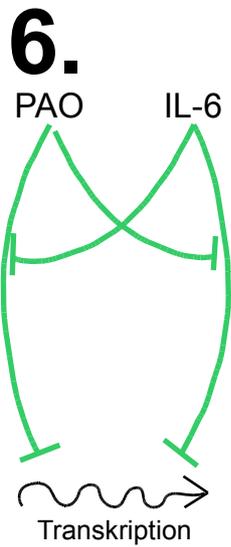
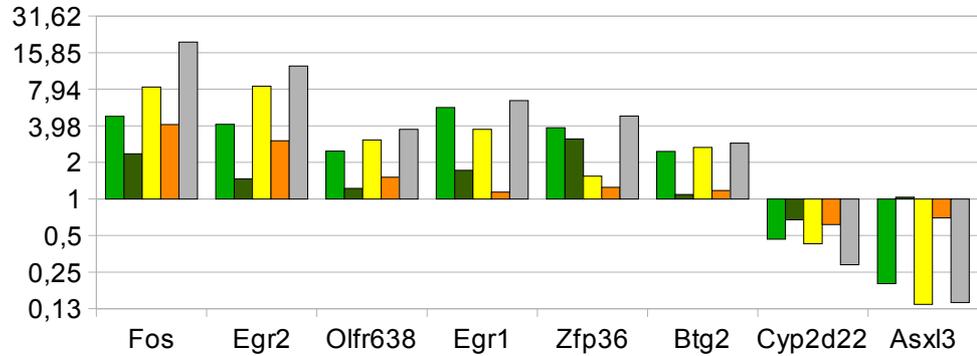
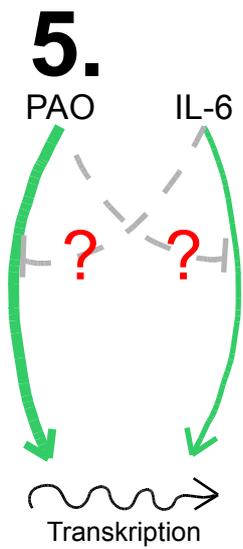


Abbildung 1: Einteilung der von IL-6 regulierten Gene nach der möglichen Wechselwirkung zwischen IL-6 und PAO. Die y-Achse (logarithmisch skaliert) zeigt den Faktor, um den das Expressionsniveau eines Gens verändert wurde. Werte über 1: Hochregulation; Werte unter 1: Herunterregulation.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Augustinus Bader für die Möglichkeit, ein spannendes Thema in einem gut ausgestatteten Labor sehr selbständig zu bearbeiten. Durch die Vielfalt von Themen, die ich in den drei Jahren bearbeitete, und die Freiheit bei der Projektplanung konnte ich meine theoretischen und praktischen Kenntnisse über den Rahmen dieser Promotionsarbeit hinaus erweitern.

Herrn Prof. Sven-Erik Behrens von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich für seine Bereitschaft danken, mich als externe Doktorandin zu betreuen und mir dadurch die Promotion zum Dr. rer. nat. zu ermöglichen. Dank seiner freundlichen und beständigen Unterstützung, sowohl fachlich als auch organisatorisch, habe ich Licht in der Nachtwissenschaft gefunden.

Frau Prof. Karin Breunig von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und angenehme Gespräche mit konstruktiven Anregungen.

Besonderer Dank gilt meiner Kollegin Dipl. Ing. Isabell Schulz für die hervorragende Zusammenarbeit im BMBF-Projekt „Endosys“ und für ihr großes Interesse und die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit. Ich danke ihr für große aber auch kleine Hilfen, von Wochenend-Vorbereitungen und Leberpräparation bis zu fruchtbaren Diskussionen der Ergebnisse und Korrektur dieser Dissertation. Nach drei Jahren Zusammenarbeit waren unsere Hände sogar mitten in einem Versuch völlig austauschbar.

Weiter danke ich Herrn Dipl. Ing. Mario Keller für die wertvolle Diplomarbeit in „Endosys“, deren Ergebnisse zur Entwicklung einiger Ideen für die Dissertation beigetragen haben, für Überstunden am Wochenende, sowie für die Durchführung einiger PCRs und Western Blots, nachdem ich die Arbeitsgruppe verlassen hatte.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zelltechniken und angewandte Stammzellbiologie bedanke ich mich für die schöne Zeit im Labor.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Mann Sascha nicht nur für seine Geduld und Rücksicht während den letzten Jahre, sondern auch für seine Weiterbildung zum Biologen durch unsere häufige Gespräche am Abend und am Wochenende, für die Freizeitzusammenarbeit zur Entwicklung und Veröffentlichung unserer gemeinsamen Publikation und für die sehr detaillierte sprachliche Verbesserung dieser Dissertation.

Herrn Michael Sonntag von *Biostep GmbH* danke ich für sein freundliches Entgegenkommen, unter anderem für die kostenlose *AmphiGreen Fluo*-Lösung und die Leihgabe von *SYBR Green*-Filter und UV-Lampen.

Dr. Anja Zeigerer vom Max Plank-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik Dresden

danke ich für produktive Diskussionen, Anregungen und wissenschaftlichen Austausch im Projekt „Endosys“.

Herrn Prof. Wolfgang Mikulits vom Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien danke ich für die freundliche Unterstützung durch fachliche Diskussionen und Vorschläge bei der während der letzten Monaten der Arbeit entstandenen Frage zur Transformation der Hepatozyten in Kultur.

Für eine Fachkorrektur der Dissertation aus neutraler Sicht sowie für die Aufmunterung während des Zusammenschreibens bedanke ich mich herzlich bei Dr. Sophie von Elsner.

Da ich keine Diplombiologin bin, wäre diese Doktorarbeit ohne weitere Bildung nicht möglich gewesen. Hier möchte ich mich bei allen Dozenten der TU-Braunschweig bedanken, deren Vorlesungen und Praktika ich vor dem Beginn dieser Doktorarbeit besucht habe, und bei den ehemaligen Kollegen des Instituts für Genetik der TU-Braunschweig, besonders Dr. Juan Cabello, Dr. Marcus Bischoff, Dr. Sophie von Elsner, Dr. Ingo Büssing und Dipl. Biol. Ufuk Günesdogan, die mir viel mehr als das gute wissenschaftliche Arbeiten in einer freundschaftlichen und gleichzeitig ambitionierten Umgebung beigebracht haben.

Der *Deutsche Bahn AG* danke ich für die Möglichkeit, die mehr als 2400 Stunden Zugfahrt zwischen Magdeburg und Leipzig mit dem Dokumentieren und Auswertung meiner Arbeit verbringen zu können.

Die Durchführung der Promotionsarbeit wäre ohne das Bundesministerium für Bildung und Forschung nicht möglich gewesen, deshalb bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

*Summer has come and passed
The innocent can never last
Wake me up when september ends*

BJ Armstrong

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich bis jetzt weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eine Dissertation zur Erlangung eines Dokortitels eingereicht habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Wo Ergebnisse verwendet sind, die in Zusammenarbeit mit anderen Personen erarbeitet wurden, ist dies im Text vermerkt.

Felicia Heidebrecht

Braunschweig, den 9. September 2009

Publikationsliste

1. **Heidebrecht F, Heidebrecht A, Schulz I, Behrens SE and Bader A, Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range, *Journal of Immunological Methods* 2009, 345: 40-48;**
2. **Heidebrecht F*, Schulz I*, Keller M, Behrens SE and Bader A, Improved Protocols for Protein and RNA Isolation from 3D Collagen Sandwich Cultures of Primary Hepatocytes, *Analytical Biochemistry* 2009, 393 (1):141-4.**

* These authors contributed equally to the work

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: **Simona Felicia Heidebrecht, geb. Timariu**
Geburtsdatum und –ort: 11. Juni 1978 in Cluj-Napoca, Rumänien
Familienstand: verheiratet seit 26.05.2006;

Ausbildung

1993-1997: Lyzeum „Nicolae Balcescu“, Cluj-Napoca, Abschluss mit Abiturzeugnis und Ausbildungszeugnis im Fachbereich Informatik, Beruf Hilfsprogrammierer;
1997-2001: Technische Universität Cluj-Napoca, Fakultät für Maschinenbau, angewandte Mathematik, Abschluss mit Ingenieur-Diplom;
2001-2002: Deutschkurse an der TU Braunschweig, Abschluss: DSH-Prüfung;
2002 – 2005: Vorlesungen und Praktika an der TU Braunschweig, Studiengang Biologie;

Berufliche Praxis

Feb. 2003 – Mai 2005: Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik der TU Braunschweig;
Okt. 2005 - Dez. 2008: Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Zelltechniken und Angewandte Stammzellbiologie am Biomedizinischen-Biotechnologischen Zentrum der Universität Leipzig;
seit Januar 2009: Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Leibniz-Universität Hannover, Institut für Mehrphasenprozesse und Zentrum für Biomedizintechnik.

Braunschweig, den 9. September 2009