

"Proliferation und Funktion serumfrei kultivierter 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

Herrn Christian Schneider

geb. am 18.09.1972 in Wippra

Gutachter

1. Prof. Dr. R. Rudolph
2. Prof. Dr. B. Christ
3. Prof. Dr. W. Gerlich

Datum der Einreichung: 10.04.2007

Datum der Verteidigung: 15.11.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000013337

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013337>]

Das kostbarste Vermächtnis eines Menschen
ist die Spur, die seine Liebe
in unseren Herzen zurückgelassen hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan	1
1.2	Therapie von Lebererkrankungen	3
1.2.1	Lebertransplantation	3
1.2.2	Lebersupport-Systeme	3
1.2.3	Hepatozytentransplantation	4
1.3	Aufgabenstellung	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Geräte	7
2.1.2	Chemikalien	7
2.2	Methoden	13
2.2.1	Präparation der Hepatozyten	13
2.2.2	Zellkultur	15
2.2.3	Präparation von Nichtparenchymzellen (NPC)	15
2.2.4	Kultur von Rattenhepatozyten mit TNF α , ATP, Serum	16
2.2.5	Splitting von Schweinehepatozyten	17
2.2.6	Proliferationsassays	17
2.2.7	Funktionsassays	19
2.2.8	Proteinbiochemische Methoden	20
2.2.9	Methoden zur Isolierung und Modifikation von Nukleinsäuren	28
2.2.10	Hepatozytentransplantation	31
2.2.11	Gewinnung von Ovalzellen	32
2.2.12	Microarray-Analysen	33
2.2.13	Klonierung von Fox m1b in den pIRES2-EGFP Vektor	35
2.2.14	Transfektion mit dem Fox m1b-pIRES-EGFP-Plasmid (Fox-GFP)	36
2.2.15	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	37
2.2.16	Tierexperimentelle Arbeiten	37
2.2.17	Ethikvotum	37
2.2.18	Gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 (S1)	38
2.2.19	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Einführende Anmerkungen	39
3.1.1	Proliferationsassays	39
3.1.2	Funktionsassays	40
3.2	Proliferation und Funktion humaner Hepatozyten	40
3.2.1	Proliferation humaner Hepatozyten	40
3.2.2	Spezifische Funktionen in humanen Hepatozyten	43
3.3	Proliferation und Funktion von Schweinehepatozyten	46
3.3.1	Proliferation von Schweinehepatozyten	46
3.3.2	Spezifische Funktionen in Schweinehepatozyten	47
3.4	Subkultur von Schweinehepatozyten	48
3.4.1	Proliferation passagierter Schweinehepatozyten	49
3.4.2	Spezifische Funktionen in passagierten Schweinehepatozyten	52

3.5	Proliferation und Funktion von Rattenhepatozyten	57
3.5.1	Proliferation von Rattenhepatozyten	57
3.5.2	Spezifische Funktionen in Rattenhepatozyten	60
3.6	Hepatozytäre Marker serumfrei kultivierter Rattenhepatozyten	63
3.7	Leberrepopulation durch serumfrei kultivierte Rattenhepatozyten	66
3.7.1	Transplantation vier Tage kultivierter Hepatozyten.....	66
3.7.2	Transplantation sieben Tage kultivierter Hepatozyten.....	68
3.8	Genexpressionsanalysen unter Verwendung von Microarrays.....	69
4	Diskussion.....	78
4.1	Determinanten der proliferativen Kapazität serumfrei kultivierter Hepatozyten.....	78
4.1.1	Zelluläre Faktoren	78
4.1.2	Extrazelluläre Faktoren	83
4.2	Funktionalität serumfrei kultivierter Hepatozyten.....	88
4.2.1	Hepatozytenspezifische Funktionen in Primärkulturen	88
4.2.2	Hepatozytenspezifische Funktionen in passagierten Hepatozyten.....	90
4.2.3	Hepatozytenspezifische Funktionen transplanteder Hepatozyten nach <i>in vitro</i> -Expansion ...	91
4.3	Klinische Implikationen.....	92
5	Zusammenfassung	95
6	Literatur	97

Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminfluoren
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
ALF	akutes Leberversagen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antisense
AT	Adenosin-Thymidin
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIAP	Alkalische Phosphatase
CK18	Cytokeratin 18
CK19	Cytokeratin 19
CPP	Kollagenase-Perfusionspuffer
CPS I	Carbamylphosphatsynthetase I (mitochondriale Form)
CPT-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt
CX32	Connexin 32
CX43	Connexin 43
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1
CYP2B1	Cytochrom P450 2B1
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
dATP	desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	desoxy-Cytidin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	desoxy-Guanosin-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
dT	desoxy-Thymidin
dTTP	desoxy-Thymidin-Triphosphat
E-64	Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butan
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	endothelial growth factor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EROD	Ethoxyresorufin
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGF	hepatocyte growth factor
HGM	hepatocyte growth medium
HHMM	human hepatocyte maintenance medium
HMDS	Hexamethyldisilazan
IgG	Immunglobulin γ
IPP	Immunpräzipitationspuffer

ITS	Insulin-Transferrin-Selenit-Supplement
KRP	Krebs-Ringer-Puffer
LB	Luria-Bertani
MACS	magnetic cell sorting
MEM	Minimum Essential Medium nach Eagle
M-MLV	moloney murine leukemia virus
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
NPC	Nichtparenchymzellen
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
PBS	phosphate balanced saline
PCIA	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCK1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (zytosolische Form)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PERV	porcines endogenes Retrovirus
PHx-Serum	Serum aus Ratten (48 h nach partieller Hepatektomie)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PPP	Prä-Perfusionspuffer
PROD	Pentoxyresorufin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rF	relative Feuchte
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
S	Sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
SMART	Switching Mechanism At the 5' end of the RNA Transcript
SOC-Medium	Super optimal catabolite repression medium
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TGF-1 β	transforming growth factor 1 β
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF α	Tumor necrosis factor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
UV	Ultraviolett
α SMA	alpha smooth muscle actin

1 Einleitung

Ode an die Leber

*„Dort; tief im Innern
Filtrierst und verteilst Du,
Teilst und trennst Du,
Vermehrst und schmierst Du.
Du schöpfst und erntest den Stoff des Lebens.*

*Von Dir erhoffe ich Gerechtigkeit:
Ich liebe das Leben; verrate mich nicht!
Schaffe weiter,
Lass mein Lied nicht sterben.“*

Pablo Neruda
(1904-1972)

1.1 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan¹

Die Leber eines gesunden Erwachsenen wiegt ca. 1,5 kg und stellt das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen dar. Sie ist weich-elastisch, dunkel-rostbraun und liegt im Oberbauch direkt unter dem Zwerchfell. Anatomisch können zwei große Leberlappen unterschieden werden, wobei der rechte Leberlappen (*Lobus dexter*) deutlich größer als der linke Leberlappen (*Lobus sinister*) ist. Daneben gibt es noch zwei weitere, sehr viel kleinere Leberlappen (*Lobus quadratus*, *Lobus caudatus*). Die Leberlappen untergliedern sich weiter in Leberläppchen, die wiederum aus Leberbälkchen aufgebaut sind. Zur Eigenversorgung mit Sauerstoff verfügt die Leber über das normale arteriovenöse Gefäßsystem. Zusätzlich verfügt sie über das sogenannte Pfortadersystem, welches nährstoffreiches Blut von Magen und Darm zur Leber transportiert.

Die Leber besteht aus unterschiedlichen Zelltypen. Mit etwa 60% der Zellen und ca. 80% des Lebervolumens stellen die Hepatozyten die dominierende Zellpopulation dar (Arterburn *et al.* 1995). In den Hepatozyten finden die eigentlichen Stoffwechsel- und Synthesevorgänge statt. Mit Ausnahme von Antikörpern und des *von Willebrand*-Faktors werden nahezu alle im Blutplasma vorkommenden Proteine von den Hepatozyten synthetisiert. Dazu zählen Hormone, Blutgerinnungsfaktoren und Transportproteine. Täglich werden in der Leber etwa 50 g Protein gebildet, davon entfallen allein 14 g auf Albumin (Arias *et al.* 1994).

¹ Sofern nicht anders kenntlich gemacht, wurden die Grundlagen zu Anatomie und Biochemie der Leber aus dem *Lehrbuch Anatomie* (Lippert, 1996) sowie *Biochemie und Pathobiochemie* (Löffler&Petrides, 1998) entnommen.

Wenige Stunden nach lokalen Entzündungsreaktionen werden durch die Hepatozyten vermehrt Akut-Phase-Proteine (z.B. Fibrinogen, α_1 -Antitrypsin, c-reaktives Protein) synthetisiert und an das Blut abgegeben. Diese Proteine helfen bei der Lokalisation der Entzündung, verhindern deren Ausbreitung und versetzen so den Organismus in die Lage, adäquat auf die Entzündung zu reagieren.

Die Leber ist das zentrale Organ der Glucosehomöostase. Während der Resorptionsphase nach Nahrungsaufnahme wird ein Großteil der Nahrungskohlenhydrate in Form von Glykogen in den Hepatozyten gespeichert. In der postresorptiven Phase kann dann das Glykogen mobilisiert und in Glucose umgewandelt werden. Wenn die Glykogenvorräte nicht mehr zur Deckung des Energiebedarfs von Zentralem Nervensystem, Nierenmark und Erythrozyten ausreichen, werden im Zuge der Gluconeogenese Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen (Lactat, Glycerin, glucogene Aminosäuren) „recycelt“ und zu Glucose umgewandelt.

Entgiftungsreaktionen finden in beschränktem Umfang in nahezu allen Geweben statt, die Leber ist jedoch das wichtigste Entgiftungsorgan des Körpers. Mit dem Ziel der Überführung apolarer, lipohiler in polare, hydrophile und damit leicht ausscheidbare Substanzen werden sowohl Endobiotica (Intermediärmetabolite) wie auch Xenobiotica (Pharmaka, Pestizide, Lösungsmittel) biologisch transformiert. Diese Biotransformation findet in zwei Phasen statt. In der ersten Phase werden durch oxidative/reduktive Reaktionen reaktive Gruppen (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) erzeugt. In der zweiten Phase werden die oxidativ/reduktiv modifizierten Substanzen über diese reaktiven Gruppen an polare, stark geladene Substanzen gekoppelt und schließlich über Galle bzw. Blut/Urin ausgeschieden.

Neben den Hepatozyten enthält die Leber auch noch die sogenannten Nichtparenchymzellen. Sie repräsentieren rund 40% der Leberzellen und erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben: Endothelzellen kleiden Blutgefäße aus und eliminieren Makromoleküle aus dem Blut. Kupffer-Zellen sind als Makrophagen Teil des organspezifischen Immunsystems und zur Phagocytose von Bakterien, Viren, Immunkomplexen und Endotoxinen imstande. Während der Leberregeneration sezernieren sie wichtige Chemokine und Mediatoren (z.B. TNF α , TGF-1 β). Ito-Zellen speichern Fett und Vitamin A, sie produzieren wesentliche Komponenten der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Kollagen Typ I, III, IV, VI u.a. Proteoglykane) und spielen damit eine besondere Rolle bei der Entwicklung der Leberzirrhose.

1.2 Therapie von Lebererkrankungen

Viele Funktionen der Leber können durch kein anderes Organ des Körpers übernommen werden. Erkrankungen, die mit dem Verlust wichtiger Leberfunktionen einhergehen, aber auch genetische Defekte, die primär die Leber betreffen, können daher lebensbedrohend sein. In der Folge eines akuten Leberversagens (ALF), gekennzeichnet durch schwere Störungen oder Ausfall von Leberfunktionen (Proteinsynthese, Entgiftung, Gallebildung), kann es innerhalb weniger Tage bis Wochen zu zunächst noch reversiblen Funktionsstörungen des Gehirns kommen. Dann ist eine schnelle und effiziente Therapie erforderlich, um ein Multi-Organ-Versagen und neuro-degenerative Schädigungen des Gehirns zu vermeiden.

1.2.1 Lebertransplantation

Als Standard-Therapie bei ALF gilt heute die orthotope Lebertransplantation (Bismuth *et al.* 1995, Moreno Gonzalez *et al.* 1995, Strom *et al.* 1997b). Der wachsenden Zahl von transplantationsbedürftigen Patienten steht jedoch ein weitaus geringeres Aufkommen an transplantierbaren Lebern gegenüber. So wurden nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) im Jahr 2005 rund 1400 Neuanmeldungen für eine Lebertransplantation registriert, im gleichen Zeitraum aber nur 888 Lebertransplantationen (aus postmortalen Organspenden) und weitere 78 aus Leber-Lebendspenden durchgeführt (www.dso.de, Stand: 28.03.2007).

1.2.2 Lebersupport-Systeme

Aufgrund dieser Kluft zwischen Bedarf und Verfügbarkeit von Spenderlebern wurden in der Vergangenheit verschiedene Support-Systeme mit dem Ziel entwickelt, eine extrakorporale Reinigung des Blutes zu erzielen. Solche Systeme sind dazu bestimmt, bei akutem Leberversagen die Zeit bis zur Verfügbarkeit eines Spenderorgans zu überbrücken. Man unterscheidet biologische und nicht-biologische Systeme (Rozga 2006, van de Kerkhove *et al.* 2004). Nicht-biologische Systeme entfernen durch Diffusion, Filtration, Dialyse und/oder Adsorption (Ionenaustauscher, Aktivkohle) wasserlösliche und proteingebundene Substanzen aus dem Blut. Diese Entfernung ist unspezifisch, so dass auch andere, nicht toxische und teils essentielle Substanzen (Vitamine, Spurenelemente) eliminiert werden. Zudem kann damit bestenfalls ein Teil der Detoxifikationsleistungen der Leber nachgebildet werden, die Syntheseleistungen (Gerinnungsfaktoren, Transportproteine, Galle etc.) werden dadurch nicht ersetzt. Darin liegt möglicherweise die Ursache für die nur mäßigen Erfolge nicht-biologischer Lebersupport-Systeme (van de Kerkhove *et al.* 2004). In den biologischen

Lebersupport-Systemen kommen intakte, vitale humane oder porcine Hepatozyten, seltener auch Zelllinien zum Einsatz. Die Zellen sind sowohl in der Lage, toxische Substanzen zu entgiften, als auch die nötigen Syntheseleistungen zu erbringen. Die Verwendung xenogener Hepatozyten beinhaltet dabei die Gefahr der Übertragung von Xenozoonosen und bei wiederholter Anwendung der Support-Systeme können immunreaktive xenogene Plasmaproteine zu einer Sensibilisierung des Patienten führen (Hammer 2002). Ein therapeutischer Nutzen der biologischen Lebersupport-Systeme ist heute weitgehend anerkannt. Es finden sich auch einzelne Berichte darüber, dass eine Anwendung von Lebersupport-Systemen innerhalb weniger Tage zur kompletten Regeneration der Leber geführt hatte und damit eine Lebertransplantation nicht mehr erforderlich war (van de Kerkhove *et al.* 2004).

1.2.3 Hepatozytentransplantation

Lebererkrankungen betreffen häufig primär nicht alle Zellpopulationen der Leber, sondern nur die kleinsten funktionellen Einheiten der Leber, die Hepatozyten. Der komplette Verlust dieser, in metabolischer Hinsicht wichtigsten Leberzellpopulation ist lebensbedrohlich. Theoretisch kann die Transplantation des kompletten Organs durch eine Hepatozytentransplantation ersetzt werden. Die erkrankte Leber dient dabei als Matrix für die transplantierten Hepatozyten, die entweder über die Milz oder über die Portalvene appliziert werden können. Von dort aus werden sie mit dem Blutstrom in kleinste Kapillargefäße geschwemmt und können dort die Endothelbarriere durchdringen und in die Matrix der Wirtsleber integrieren. Sie übernehmen dann die Funktion der geschädigten Hepatozyten. Wenn mit der Lebererkrankung ein Verlust an Zellmasse verbunden ist, führt dies zusätzlich zu einem Proliferationsstimulus, der die transplantierten und die gesunden endogenen Hepatozyten proliferieren lässt. In tierexperimentellen Studien konnte erfolgreich gezeigt werden, dass zellspezifische Eigenschaften und Funktionen transplantierten Hepatozyten, wie z.B. Gap junctions, Zellpolarität, Glykogenspeicherung und Albuminsynthese auch in der Wirtsleber erhalten bleiben (Aurich *et al.* 2005, Gupta *et al.* 1991, Laconi *et al.* 1998).

Etwa 20-25% der explantierten humanen Spenderlebern können aufgrund einer Steatose oder Leberzirrhose nicht transplantiert werden (Gerlach *et al.* 2002). Diese Organe können aber durchaus noch für die Isolierung von Hepatozyten zur Bestückung von Lebersupport-Systemen oder zur Zelltransplantation genutzt werden. In der Literatur finden sich eine Reihe publizierter Fälle von Hepatozytentransplantation beim Menschen (Ohashi *et al.* 2001, Fox *et al.* 2004, Guha *et al.* 2001, Strom *et al.* 1997b, Dhawan *et al.* 2006).

In Tabelle 1 wurden einige davon beispielhaft zusammengestellt. Die Ergebnisse dieser Hepatozytentransplantationen waren bisher jedoch eher unbefriedigend. Häufig gelang es zwar, die Zeit bis zur Lebertransplantation zu überbrücken, aber nur in Einzelfällen wurde eine vollständige Leberregeneration beobachtet (Fisher *et al.* 2000, Habibullah *et al.* 1994). Als ursächlich für den geringen therapeutischen Effekt der bisher durchgeführten Hepatozytentransplantationen wird die mindere Qualität der zur Verfügung stehenden Lebern und damit auch der daraus isolierten Hepatozyten erachtet (Fox *et al.* 2004, Ohashi *et al.* 2001).

Erkrankung	Hepatozyten	Ergebnis
Glycogenose Typ I (Muraca <i>et al.</i> 2002)	allogen, frisch isoliert	Messbare Enzymaktivität, keine Hypoglykämien bei normaler Diät
Crigler-Najjar-Syndrom Typ I (Fox <i>et al.</i> 1998, Ambrosino <i>et al.</i> 2005)	allogen, frisch isoliert	Messbare Enzymaktivität, spätere Lebertransplantation wegen weiterhin erforderlicher Phototherapie
Familiäre Hypercholesterinämie (Grossman <i>et al.</i> 1995)	autolog (nach <i>ex vivo</i> Gentherapie)	Transgene Rezeptor-Expression, Reduktion des LDL bei einigen Patienten
α_1 -Antitrypsin-Mangel (Strom <i>et al.</i> 1997a)	allogen, kryokonserviert	48-stündige Überbrückung bis zur Leber- und Nierentransplantation
Chronisches Leberversagen (Leberzirrhose/Hepatitis) (Mito <i>et al.</i> 1992)	autolog, frisch isoliert	Bis 11 Wo nach Transplantation: Nachweis transplantiertes Hepatozyten in der Milz
Akutes Leberversagen (Habibullah <i>et al.</i> 1994)	allogen, fötal	Bei 3 von 7 Patienten komplette Genesung

Tabelle 1: Exemplarische Übersicht über beim Menschen durchgeführte Hepatozytentransplantationen

Im Vergleich zu einer Lebertransplantation ist eine Hepatozytentransplantation ein wenig invasiver Eingriff und mit deutlich geringeren Kosten verbunden. Zudem bleibt die körpereigene Leber erhalten, so dass die Hepatozytentransplantation im Bedarfsfall wiederholt werden kann. Es besteht auch weiterhin die Möglichkeit zur Transplantation eines kompletten Organs. Neben Kosten, apparativem Aufwand und medizinischem Risiko hat die Hepatozytentransplantation auch den Vorteil, dass mit den Zellen aus einem Organ ausreichend Zellen für 4-5 Anwendungen am Patienten zur Verfügung stehen². Praktisch kann aus marginalen Lebern oft aber nur ein Bruchteil der Hepatozyten eines gesunden Organs isoliert werden.

² Die Leber eines durchschnittlichen Erwachsenen (70 kg) enthält ca. 3×10^{11} Hepatozyten (Fox, 1998)

Ein weiteres Problem stellt die erforderliche Menge an zu transplantierenden Hepatozyten dar. Ausgehend von tierexperimentellen Studien wird geschätzt, dass etwa 20% der Lebermasse erforderlich sind, um eine normale Leberfunktion zu gewährleisten (Ohashi *et al.* 2001, van de Kerkhove *et al.* 2004). Die Menge an Hepatozyten, die bei einer einzelnen Hepatozytentransplantation appliziert werden kann, beschränkt sich auf maximal 5% der Lebermasse. Werden mehr Zellen transplantiert, steigt das Risiko von Thrombosen und pulmonaler Dysfunktionen durch Migration transplantierte Zellen in die Lunge (Ohashi *et al.* 2001). Die Zelltransplantation muss daher, mit zeitlichem Abstand, mehrfach wiederholt werden, um eine ausreichende Menge Zellen zum funktionellen Leberersatz bereit zu stellen. Dies wiederum erfordert die permanente Verfügbarkeit transplantierbarer Hepatozyten, die ggf. durch eine Kurzzeitkultivierung gewährleistet werden könnte, wobei diese Kultur mit einem Verlust zellspezifischer Funktionen verbunden sein kann. Alternativ könnten die isolierten Hepatozyten auch kryokonserviert werden. Die Kryokonservierung ist derzeit aber immer noch mit einem hohen Verlust an überlebensfähigen Zellen verbunden.

Insbesondere bei der Korrektur monogenetischer Defekte der Leber bietet sich die Verwendung autologer Hepatozyten an. Ähnlich wie bei der Behandlung von Knorpel- oder Hautdefekten könnten patienteneigene Zellen entnommen, gentechnisch korrigiert, *in vitro* expandiert und anschließend re-transplantiert werden. Durch autologe Hepatozytentransplantationen könnten akute Abstoßungsreaktionen sowie die lebenslange Immunsuppression bei allogener Zelltransplantation vermieden werden. Es muss das Ziel der *in vitro*-Expansion sein, die Zellzahl im Hinblick auf die spätere klinische Anwendung unter Erhalt der hepatozytären Eigenschaften zu vervielfachen. Dies ist insofern schwierig, da die Verwendung tierischer Materialien in der Zellkultur (z.B. fötales Kälberserum) vermieden werden muss, um die Gefahr von Xenozoonosen auszuschließen.

1.3 Aufgabenstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung kultivierter humaner Hepatozyten unter serumfreien Bedingungen sowie in Untersuchungen zur Proliferationskapazität und zum Funktionserhalt unter proliferativen Bedingungen *in vitro*. Mögliche, für die Proliferation der Zellen wichtige molekulare Targets sollten identifiziert werden. Da humane Hepatozyten nur in begrenzter Menge und Qualität zur Verfügung standen, sollten die Untersuchungen im Wesentlichen mit Hepatozyten von Ratte und Schwein als Modell durchgeführt und anschließend mit humanen Zellen verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte, die zur Standardlaborausstattung gehören, wurden nicht gesondert aufgeführt. Auf spezielle Geräte wird an entsprechender Stelle im Methodenteil eingegangen.

2.1.2 Chemikalien

Eine Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien findet sich im Anhang. Sämtliche Chemikalien und Reagenzien entsprachen dem Reinheitsgrad p.A. bzw. Zellkulturgetestet.

Die Herstellung von wässrigen Lösungen und Puffern erfolgte mit Reinstwasser. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid bzw. Salzsäure eingestellt.

2.1.2.1 Lösungen, Reagenzien, Puffer, SDS-Gele

Stock colour reagent A

20 g/l Diacetylmonoxim in Aqua bidest.

Stock colour reagent B

5 g/l Thiosemicarbacid in Aqua bidest.

Stock acid reagent

10 g/l Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, 200 ml ortho-Phosphorsäure, 300 ml Aqua bidest.

Mixed acid reagent

100 ml Schwefelsäure (98%ig), 400 ml Aqua bidest., 300 µl stock acid reagent

Mixed colour reagent

35 ml Stock colour reagent A, 35 ml Stock colour reagent B, 470 ml Aqua bidest.

DAB-Lösung

20 µl DAB-Chromogen, 1 ml Substrat-Puffer

1x Blotto

2,424 g/l Tris, 8,813 g/l Natriumchlorid, 1 ml 1%iges Tween 20 (w/w) in Aqua bidest.

5%iges Blotto

50 g/l Magermilchpulver in 1x Blotto

1%iges Blotto

10 g/l Magermilchpulver in 1x Blotto

3M Kaliumacetatlösung (pH 7,5)

60 ml Kaliumacetatlösung (5M), 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Aqua bidest.

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCIA)

Gemisch aus Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 25:24:1

Kanamycin-Lösung

50 mg/ml Kanamycin in Aqua bidest.

75%iges Ethanol in DEPC-Wasser

3 Teile 100%iges Ethanol + 1 Teil DEPC-Wasser

50 mM Tris (pH 7,6)

6,05 g/l Tris in Aqua bidest.

DAPI-Stock-Lösung

1 mg/ml in Aqua bidest.

Immunpräzipitationspuffer (IPP)

10 ml/l Triton X-100, 8,766 g/l Natriumchlorid, 3,723 g/l EDTA, 0,380 g/l EGTA, 10 mg/l Aprotinin, 10 mg/l Antipain, 10 mg/l Leupeptin, 10 mg/l Pepstatin, 174,2 mg/l PMSF, 183,9 mg/l Natriumorthovanadat, 35,84 µg/l E-64 in Aqua bidest.

SDS-Probenpuffer

7,57 g/l Tris-HCl, 20 g/l SDS, 50 g/l 2-Mercaptoethanol, 100 g/l Glycerin, 0,1 g/l Bromphenolblau-Natriumsalz in Aqua bidest.

Laufpuffer

3,1 g/l Tris, 14,4 g/l Glycin, 10 ml 10%iges SDS (w/v) in Aqua bidest.

Transferpuffer

6,058 g/l Tris, 7,132 g/l Glycin, 0,5 ml 10%iges SDS (w/v) in Aqua bidest.

S&M-Puffer (nach Strom & Michalopoulos, pH 7,4)

0,5 g/l Kaliumchlorid, 8,3 g/l Natriumchlorid, 2,4 g/l HEPES, 190 mg/l Natriumhydroxid in Aqua bidest.

TBE-Puffer (pH 8,0)

10,89 g/l Tris, 5,5 g/l Borsäure, 5 ml 0,5 M EDTA in Aqua bidest.

Waschpuffer (pH 7,4)

4,77 g/l HEPES, 7,00 g/l Natriumchlorid, 0,36 g/l Kaliumchlorid, 0,30 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,16 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 4,00 g/l BSA in Aqua bidest.

Krebs-Ringer-Puffer

7,00 g/l Natriumchlorid, 0,36 g/l Kaliumchlorid, 0,30 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,16 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 2,02 g/l Natriumhydrogencarbonat in Aqua bidest.

Prä-Perfusionspuffer (pH 7,35; 37°C)

300 ml Krebs-Ringer-Puffer, 30 mg EGTA

Kollagenase-Perfusionspuffer (pH 7,35; 37°C)

200 ml Krebs-Ringer-Puffer, 118 mg Calciumchloriddihydrat, 714 mg HEPES, 136,5 U/ml Kollagenase CLS II (Biochrom)

Puffer 1 (pH 7,6; 42°C)

2,30 g/l HEPES, 8,29 g/l Natriumchlorid, 0,50 g/l Kaliumchlorid, 0,38 g/l EGTA, 0,20 g/l D-Glucose in Aqua bidest.

Puffer 2 (pH 7,6; 42°C)

2,30 g/l HEPES, 8,29 g/l Natriumchlorid, 0,50 g/l Kaliumchlorid, 0,20 g/l D-Glucose in Aqua bidest.

Puffer 3 (pH 7,6; 42°C)

5,95 g/l HEPES, 7,18 g/l Natriumchlorid, 0,50 g/l Kaliumchlorid, 0,705 g/l Calciumchloriddihydrat, 0,90 g/l D-Glucose, 5,00 g/l BSA, 50 mg/l DNase I (Sigma-Aldrich), 143.000 U/l Kollagenase Typ 1 (Worthington) in Aqua bidest.

Prä- und Kollagenase-Perfusionspuffer sowie die Puffer 1-3 wurden vor ihrer Verwendung 30 min mit Carbogen begast, sterilfiltriert und auf die angegebene Temperatur erwärmt.

SDS-Trenngel (12%)

6 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30% w/v), 3,75 ml 1,5 M Tris, 150 µl 10%iges SDS (w/v), 7,5 µl TEMED, 75 µl 10%iges APS (w/v), 5,02 ml Aqua bidest.

SDS-Sammelgel (9%)

1,50 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30% w/v), 1,25 ml 0,5 M Tris, 50 µl 10%iges SDS (w/v), 2,5 µl TEMED, 25 µl 10%iges APS (w/v), 2,175 ml Aqua bidest.

2.1.2.2 Nährmedien*Einsaatmedium: Minimum Essential Medium Eagle (MEM)*

1 Ampulle MEM (Pulvermedium), 0,35 g/l Natriumhydrogencarbonat, 5 µg/l Insulin, 50 µg/l Gentamycin in Aqua bidest.

*Kulturmedium:*HGM (Ratten- und Schweinehepatozyten)

500 ml DMEM (ohne Glucose), 500 ml DMEM (mit 4,5 g/l Glucose), 2,00 g/l BSA, 2,00 g/l D-Galactose, 0,10 g/l L-Ornithin, 30 mg/l L-Prolin, 2,38 g/l HEPES, 0,305 g/l Niacinamid, 0,146 g/l L-Glutamin, 54,52 µg/l Zinkchlorid, 19,97 µg/l Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, 74,76 µg/l Zinksulfat-Heptahydrat, 25,01 µg/l Mangan(II)-sulfat-Monohydrat, Penicillin/Streptomycin (100.000 U/l Penicillin-G, 100 mg/l Streptomycinsulfat), 39,25 µg/l Dexamethason, 1 ml/l ITS-Supplement (entspricht 5 mg/l Insulin, 5 mg/l Transferrin, 5 µg/l Natrium-Selenit), 20 µg/l EGF, 40 µg/l HGF

HHMM (humane Hepatozyten)

500 ml MEM, 500 ml HGM, 20 µg/l EGF (PeproTech), 40 µg/l HGF (Pan Biotech)

Transportmedium L-15 (pH 7,35)

1 Ampulle Leibowitz' L-15 mit L-Glutamin (Pulvermedium) in Aqua bidest.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, pH 7,0)

10 g/l Pepton/Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid in Aqua bidest.

Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)

10 g/l Pepton/Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 20 g/l Agar-Agar in Aqua bidest.

SOC-Medium

LB-Medium supplementiert mit 2,033 g/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 2,465 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat und 3,604 g/l D-Glucose in Aqua bidest.

2.1.2.3 Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU, chemiluminescent (Roche Diagnostics, Mannheim)
TACS[®] Hoechst Cell Proliferation Assay (Trevigen Inc., Gaithersburg, USA)
CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Mannheim)
RevertAid[®] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen)
Bicinchoninsäure (BCA)-Kit zur Proteinbestimmung (Sigma-Aldrich, München)
BioPrime[®] DNA Labeling System (Invitrogen, Karlsruhe)
Advantage[™] 2 PCR Enzyme Systems (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

2.1.2.4 Primer

Die Synthese der Primer erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg) bzw. Invitrogen (Karlsruhe). Eine Übersicht über die eingesetzten Primer, deren Sequenzen, Annealingtemperaturen und Zykluszahlen findet sich in Tabelle 4 im Anhang.

2.1.2.5 Antikörper

Maus monoklonal anti-CD26 (Isotyp 2a) (BD Pharmingen, San Diego, USA)
Maus monoklonal anti-CK18 (Chemicon, Hampshire, UK)
Maus anti-Ratte CD90, PE-konjugiert (BD Pharmingen, San Diego, USA)
Maus monoklonal anti-Actin (Chemicon, Hampshire, UK)
Kaninchen polyklonal anti- α SMA (Abcam, Chambridge, UK)
Maus monoklonal anti-Desmin (Chemicon, Hampshire, UK)
Maus monoklonal anti-human hepatocyte (Dako, Hamburg)
Kaninchen polyklonal anti-CX32 (Sigma, München)
Kaninchen anti-PCK1 (für Details siehe Aurich *et al.* 2005)
Ziege polyklonal anti-CYP1A1 (Natutec, Frankfurt/M.)
Ziege polyklonal anti-CPS I (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, USA)
anti-Kaninchen IgG, POD-konjugiert (BD Pharmingen, San Diego, USA)
anti-Maus IgG, POD-konjugiert (BD Pharmingen, San Diego, USA)
anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor 488-konjugiert (Molecular Probes, Eugene, USA)
anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488-konjugiert (BD Pharmingen, San Diego, USA)
anti-Maus Isotyp 2a IgG, Alexa Fluor 568-konjugiert (Molecular Probes, Eugene, USA)
anti-Ziege IgG, Alexa Fluor 488-konjugiert (Molecular Probes, Eugene, USA)

anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert (Dianova, Hamburg)

anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert (Sigma, München)

anti-Ziegen IgG, POD-konjugiert (ICL Inc., Newberg, USA)

DakoCytomation EnVision⁺ System- POD, anti-Maus, ready-to-use (Dako, Hamburg)

DakoCytomation EnVision⁺ System- POD, anti-Kaninchen, ready-to-use (Dako, Hamburg)

anti-PE-Microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Hepatozyten

2.2.1.1 Rattenhepatozyten

Die Hepatozyten wurden durch die leicht modifizierte 2-Schritt *in situ*-Perfusion der Leber nach Seglen (Seglen 1976) isoliert. Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche, 6-7 Wochen alte Wistar- bzw. Fischer-Ratten (200-220 g) verwendet. Die Tiere wurden unter einem strikten Tag-Nacht-Zyklus (12 h/12 h) bei 22°C und 50% rF und freiem Zugang zu Wasser und Standard-Diätfutter gehalten.

Die Wistar-Ratten stammten aus der universitätseigenen Tierzucht (Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung), Fischer-Ratten wurden von Charles River, Sulzbach bezogen. Die Ratten wurden durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50 mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung) in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose wurden zur Hemmung der Blutgerinnung intraperitoneal 300 µl Liquemin[®]N 25000 appliziert. Der Bauch wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Zunächst wurden Oberhaut und Fell vom Unterhautgewebe gelöst und entfernt. Dann wurde der Bauchraum durch einen Schnitt entlang der *Linea alba* eröffnet. Magen und Darm wurden zur Seite verlagert und die Leber und deren Gefäße freigelegt. Die Portalvene (*Vena portae*) wurde kanüliert und unterhalb der Kanülenmündung ligiert. Die zum Herzen führende Hohlvene (*Vena cava*) wurde ligiert. Die zu den unteren Extremitäten führende Hohlvene wurde eröffnet. Bei einem Volumenstrom von 25 ml/min wurde die Leber unter Verwendung einer Schlauchpumpe (PA-SK4 C, IKA) zunächst mit Prä-Perfusionspuffer (PPP) blutfrei gespült, was an einer Aufhellung und einem leichten Anschwellen der Leber erkennbar wurde. Nach ca. 200 ml PPP wurde mit Kollagenase-haltigem Puffer (CPP) perfundiert. Die Kollagenase führte zum Verdau des Kollagens innerhalb der Leber, wodurch die Hepatozyten aus ihrer Matrix gelöst und somit mobilisiert wurden. Die Leber wurde entnommen und in Waschpuffer (4°C) überführt. Unter einer sterilen Werkbank wurde die Leberkapsel mit einer sterilen Kanüle eröffnet und die Zellen im Waschpuffer ausgeschüttelt. Die Zellsuspension wurde durch zwei Lagen einer sterilen Mullkompressen filtriert und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Durch dreimaliges Zentrifugieren (5 min bei 500 U/min, 4°C) wurden die Hepatozyten (Pellet) von den Nichtparenchymzellen (Überstand) getrennt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in MEM resuspendiert und die Vitalität durch Trypanblau-Ausschluss ermittelt. Die Zelldichte der Suspension wurde auf 3×10^5 vitale Zellen/ml eingestellt.

2.2.1.2 Schweinehepatozyten³

Alle Versuchstiere stammten aus konventioneller Haltung einer Agrargenossenschaft in Sachsen-Anhalt. Die Tiere wurden nach dem Erwerb in der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter konventionellen Haltungsbedingungen (natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus, Kraftfutter, Wasser *ad libitum*) bis zur Versuchsdurchführung gehalten. Die Schweine (Deutsche Landrasse) waren zum Zeitpunkt der Leberentnahme 10-16 Wochen alt, 20-38 kg schwer. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet.

Die Tiere wurden durch intramuskuläre Injektion von Stresnil[®], Atropin, Ketavet[®] sediert. Die Narkose wurde durch intravenöse Injektion von Propofol eingeleitet. Nach Intubation erfolgte eine Inhalationsnarkose mit 1,5 Vol-% Forene[®]. Die Tiere wurden durch intravenöse Gabe von 2,5 cm³ Liquemin[®] N 25000 heparinisiert und nach 5 min durch intravenöse Injektion von 6 cm³ T61 euthanasiert. Unmittelbar nach Herzstillstand wurde der Bauchraum der Tiere eröffnet und die komplette Leber entfernt. Ein Leberlappen wurde abgetrennt, eines der Lebergefäße wurde mit einer Glasolive kanüliert, alle anderen Gefäße wurden chirurgisch verschlossen. Das Resektat wurde unter Verwendung einer Schlauchpumpe (PA-SK4 C, IKA) bei einem Volumenstrom von 50 ml/min mit eiskaltem L-15 Medium blutfrei gespült. Der Leberlappen wurde in eine sterile Tüte gegeben und auf Eis ins Labor verbracht, wo die weitere Isolierung der Hepatozyten erfolgte. Die Tüte mit dem Leberlappen wurde in ein Wasserbad (37°C) gestellt und das Resektat sukzessive für ca. 15 min mit Puffer 1, ca. 10 min mit Puffer 2 und ca. 15 min mit Puffer 3 perfundiert. Die Dauer der einzelnen Perfusionschritte richtete sich nach den Erfordernissen der individuellen Leberpräparationen, wie z.B. Größe des Leberlappens und Perfundierbarkeit. Die Perfusion des Leberlappens mit Puffer 3 führte nur zu einem unvollständigen Verdau des Lebergewebes. Der Leberlappen wurde mit einer Schere aufgeschnitten und die mobilisierten Hepatozyten in einem Becherglas mit eiskaltem Waschpuffer ausgeschüttelt. Alle weiteren Schritte erfolgten, wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.3 Humane Hepatozyten

Humane Hepatozyten wurden aus intraoperativ gewonnenen Leberresektaten isoliert. Die Spender waren beiderlei Geschlechts, das Alter der Spender lag zwischen 51 und 69 Jahren.

³ Die Isolation der porcinen Hepatozyten erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. R. Wenkel vom Institut für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die Isolierung erfolgte analog den Schweinehepatozyten. Die Mehrzahl der Resektate konnte aufgrund ihrer Größe und Anatomie jedoch nicht dauerhaft kanüliert werden. Sie wiesen häufig große Schnittflächen und kaum intakte Gefäße auf. Unter Verwendung einer Knopfkanüle und einer 50 ml-Spritze wurden in diesen Fällen alle sichtbaren Gefäße abwechselnd perfundiert. Die Resektate wurden mit einer Schere aufgeschnitten und die Hepatozyten in einem Becherglas mit eiskaltem Waschpuffer ausgeschüttelt. Die Zellisolierung wurde, wie im Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, fortgesetzt.

2.2.2 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Nährmedien wurden sterilfiltriert, bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor ihrer Verwendung auf 37°C erwärmt.

Die Hepatozyten wurden in mit Kollagen des Typs I (Collagen R, 6 µg/cm²) beschichteten 6-Well-Platten und 10 cm-Schalen (Ø) kultiviert. Pro Well der 6-Well-Platte wurden 2 ml, pro 10 cm-Schalen 10 ml der Zellsuspension (3×10^5 Zellen/ml) pipettiert. Die Kulturschalen wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen geschwenkt und für 2 h bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde das Einsaatmedium abgesaugt und durch das entsprechende Kulturmedium ersetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurde das Medium alle 48 h gewechselt.

2.2.3 Präparation von Nichtparenchymzellen (NPC)

Die verschiedenen Zellpopulationen der Leber beeinflussen sich wechselseitig über Zell-Zell-Kontakte sowie endokrin wirksame Substanzen und andere Mediatoren. Während der Hepatozytenpräparation werden die Hepatozyten weitgehend von den Nichtparenchymzellen getrennt. Zur Nutzung der synergistischen Effekte dieser Zellpopulationen *in vitro* wurden die NPC isoliert, kultiviert und zu Co-Kultur-Studien verwendet.

Der erste Überstand aus der Hepatozytenisolierung wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Bei zwei weiteren Zentrifugationen (500 U/min, 5 min, 4°C) wurde jeweils der Überstand in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und abschließend bei 1300 U/min für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in MEM resuspendiert und die Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen ausplattiert. Nach 2 Stunden erfolgte ein Medienwechsel, die Zellen wurden gründlich mit PBS gespült und in HGM mit 20 ng/ml EGF und 10% FKS kultiviert. Die NPC-Präparationen wurden nach Erreichen von Konfluenz mehrfach passagiert und subkultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.5), bis eine ausreichende Zellzahl zur Verfügung stand.

Danach wurden diese Kulturen mit 10 µg/ml Mitomycin C für 2 h bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden die NPC an einer weiteren Proliferation gehindert werden. Für die spätere Co-Kultur war dies erforderlich, um zu verhindern, dass die schnell proliferierenden NPC die darauf ausplattierten Hepatozyten „überwachsen“.

2.2.3.1 Markierung der Hepatozyten für die Co-Kultur

Zur Unterscheidung von Hepatozyten und NPC wurden die Hepatozyten mit einem lipophilen Fluorochrom (Vybrant® DiI) markiert. Der Farbstoff lagerte sich in der Zellmembran ein und konnte dort bis zu sieben Tage beobachtet werden.

Die Hepatozyten wurden nach der Isolation mit MEM auf eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden mit 5 µM DiI für 30 min bei 37°C unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Waschen der Zellen mit MEM (zweimal 500 U/min, 5 min, 4°C) entfernt. Die Zellen wurden in MEM aufgenommen.

2.2.3.2 Co-Kultur

Nach der Markierung der Hepatozyten wurden diese auf den Kulturen der NPC ausplattiert. Nach 2 Stunden und danach alle 48 h wurde das Medium (HGM mit EGF und HGF) gewechselt. Der Kulturverlauf wurde mikroskopisch beobachtet und fotografisch dokumentiert.

2.2.4 Kultur von Rattenhepatozyten mit TNF α , ATP, Serum

TNF α

Die Hepatozyten wurden, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, kultiviert. Zusätzlich wurde das Kulturmedium jedoch mit 100 ng/ml TNF α supplementiert. Als Kontrollen wurden Zellen mit EGF/HGF bzw. ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. Zur Beschreibung der Proliferation wurde die Zellzahl ermittelt.

ATP

Die Rattenhepatozyten wurden, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, kultiviert. Das Nährmedium wurde täglich mit 100 µM ATP supplementiert. Als Referenz dienten Kulturen mit EGF/HGF sowie Kulturen ohne Wachstumsfaktoren. Die Proliferation der Zellen wurde durch Bestimmung der Zellzahl charakterisiert.

Serum

Die Rattenhepatozyten wurden, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, kultiviert. Die Kultur erfolgte jeweils mit 10% Serum, als Referenz dienten Kulturen mit und ohne Wachstumsfaktoren. Die Proliferation wurde durch Zellzählung bestimmt.

2.2.5 Splitting von Schweinehepatozyten

Die porcinen Hepatozyten wurden in 10 cm-Kulturschalen ausplattiert. Sobald die Zellen ca. 90% Konfluenz erreicht hatten (etwa alle drei Tage), wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. 4 ml Trypsin/EDTA wurden mit 143 U/ml Kollagenase Typ 1 vermischt und 5 min bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml PBS und vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und analog der Isolierung primärer Schweinehepatozyten zentrifugiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 gesplittet, das heißt, in soviel MEM resuspendiert, dass Zellen von einer 10 cm-Schale in zwei neue 10 cm-Schalen ausplattiert werden konnten. Gleichzeitig wurden Zellen in 6-Well-Platten zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens und zur Messung der verschiedenen Enzymaktivitäten ausplattiert.

2.2.6 Proliferationsassays

2.2.6.1 BrdU-Incorporation-Assay

Der BrdU-Einbau wurde mittels Cell Proliferation ELISA, BrdU, chemiluminescent (Roche Diagnostics) ermittelt. Dieser Assay beruht auf dem kompetitiven Einbau eines Thymidin-Analogons, dem 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), in die DNA. Hauptsächlich erfolgt dieser Einbau während der DNA-Neusynthese in der S-Phase des Zellzyklus proliferierender Zellen. Aber auch bei Reparaturprozessen der genomischen DNA würde BrdU in die DNA eingebaut. Das eingebaute BrdU kann z.B. durch Peroxidase-konjugierte Antikörper detektiert und photometrisch quantifiziert werden.

Die Hepatozyten wurden in 6-Well-Platten kultiviert und zur Bestimmung des BrdU-Einbaus für 2 h mit 10 µM BrdU inkubiert. Im Anschluss an das Labeling wurden die Zellen mit 2 ml FixDenat für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und gleichzeitig denaturiert. Das FixDenat wurde abgesaugt, 2 ml frisch angesetzte Antikörper-Lösung (anti-BrdU, monoklonales Fab-Fragment, Peroxidase-markiert, 1:100 verdünnt) zu den Zellen pipettiert und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit 2 ml Washing Solution gewaschen. Während der einzelnen Waschschrte wurde jeweils 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Substrate Solution wurden die Zellen für 3 min bei Raumtemperatur auf einem Orbitalshaker inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde anschließend mittels eines Mikroplattenreaders (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems) gemessen. Die gesamte Fläche des 6-Well-Platten wurde mittels Multipoint-Messung erfasst. Die Messzeit betrug dabei 200 ms je Messpunkt.

2.2.6.2 Bestimmung des DNA-Gehalts

Der DNA-Gehalt je Kulturschale wurde mit dem TACS[®] Hoechst Cell Proliferation Assay (Trevigen) bestimmt. Der verwendete Assay beruht auf der Bindung eines membrangängigen Fluorochroms (Hoechst 33342) an AT-reiche Sequenzen der zellulären DNA (Arndt-Jovin *et al.* 1977) und dessen spektroskopischer Quantifizierung.

Die Bestimmung erfolgte im Dreifachansatz. In eine 96-Well-Platte (MicroFLUOR[®]2, schwarz, Thermo Labsystems) wurden 100 µl vorgewärmter (37°C) CPA-Dilution Buffer und 50 µl Zellsuspension (aus der Zellzahlbestimmung, siehe dazu 2.2.6.3.) pipettiert und resuspendiert. Dann wurden 50 µl 1:200 in CPA-Dilution Buffer verdünntes Farbreagenz (CPA Dye 1) zu der Zellsuspension zugesetzt und die Platte abgedeckt für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Fluoreszenz mittels eines Mikroplattenreaders (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems) unter Verwendung der Filter 355 nm (Anregung) und 460 nm (Emission) gemessen. Die Messung erfolgte als Singlepoint-Messung, die Messzeit betrug 1000 ms.

2.2.6.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die in 6-Well-Platten kultivierten Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. 1 ml eines Gemisches aus Trypsin/EDTA und Kollagenase (136,5 U Kollagenase CLS II/ml für Ratte, 143 U Kollagenase Typ 1/ml für Mensch und Schwein) wurde auf die Zellen gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 2 ml PBS zugesetzt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von der Kollagen-Unterlage abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1500 U/min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1 ml CPA-Dilution Buffer resuspendiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte durch Auszählen der Zellsuspension in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

2.2.6.4 ATP-Assay

Zur Bestimmung der Vitalität der kultivierten Hepatozyten wurde der CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) verwendet. Der Assay wurde in 6-Well-Platten durchgeführt. Die Kulturplatten wurden dem Brutschrank entnommen und für 15 min auf Raumtemperatur äquilibriert. Das ATP-Reagenz wurde vor Gebrauch frisch angesetzt. Je Well wurden 2 ml ATP-Reagenz zum Kulturmedium zugesetzt. Die Zellyse erfolgte bei Raumtemperatur durch zweiminütiges Schwenken auf einem Orbitalshaker. Zur Stabilisierung des Lumineszenz-Signals wurde für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mittels eines Mikroplattenreaders (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems) gemessen. Die gesamte Fläche des 6-Wells wurde durch Multipoint-Messung erfasst. Die Messzeit betrug dabei 500 ms je Messpunkt.

2.2.7 Funktionsassays

2.2.7.1 Cytochrom P 450-Aktivität

Das Nährmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und mit frischem Nährmedium mit 8 μM Ethoxyresorufin (Metabolisierung durch Ethoxyresorufin-O-Deethylase, CYP1A1) bzw. 8 μM Pentoxyresorufin (Metabolisierung durch Pentoxyresorufin-O-Dealkylase, CYP2B1) und 10 μM Dicumarol für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung des Substratumsatzes erfolgte im Doppelansatz. 75 μl des Nährmediums wurden mit 25 μl 0,1 M Natriumacetatlösung (pH 4,5) und 0,15 μl β -Glucuronidase/Arylsulfatase für 2 h bei 39°C inkubiert. Der Zusatz von 200 μl 96%igem Ethanol stoppte die enzymatische Reaktion. Die Proben wurden 10 min bei 4000 U/min, 4°C zentrifugiert. Jeweils 150 μl des Überstandes wurden in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert und die Fluoreszenz unter Verwendung der Filter 530 nm (Anregung) und 590 nm (Emission) in einem Mikroplattenreader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems) gemessen. Die Messung erfolgte als Singlepoint-Messung, die Messzeit betrug 40 ms. Eine Standardkurve im Bereich von 0-2 μM Resorufin diente zur Berechnung des Substratumsatzes. Nach dem Assay wurde die Zellzahl (siehe Abschnitt 2.2.6.3) bestimmt. Die Angabe des Substratumsatzes erfolgte in nmol pro 10.000 Zellen pro Stunde.

2.2.7.2 Harnstoffsynthese

Die Bestimmung des Harnstoffs erfolgte durch photometrische Quantifizierung eines blau-violetten Farbstoffs, der durch die chemische Reaktion von Harnstoff mit Diacetylmonoxim und Thiosemicarbazid entsteht. Dazu wurden die Hepatozyten 24 h mit frischem Nährmedium

kultiviert. Im Doppelansatz wurden 5 µl Nährmedium mit 1,25 ml Farbreagenz (bestehend aus jeweils einem Teil dest. H₂O, Mixed acid reagent, Mixed colour reagent) versetzt und in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) für 10 min bei 95°C inkubiert. Unmittelbar danach wurden die Proben für 10 min auf Eis gekühlt und deren Absorption bei 540 nm im Spektrophotometer (Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences) bestimmt. Eine Standardreihe im Bereich von 0-75 µg Harnstoff/ml Nährmedium diente zur Bestimmung der Menge des gebildeten Harnstoffs, die in pmol pro 10.000 Zellen pro 24 Stunden angegeben wurde.

2.2.7.3 Induktion von CYP1A1-Aktivität und Harnstoffsynthese

In den kultivierten Hepatozyten wurde zunächst die CYP1A1-Enzymaktivität und die Harnstoffsyntheserate unter nicht-induzierenden Bedingungen ermittelt. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µM β-Naphthoflavon (Induktion von CYP1A1) oder CPT-cAMP (Induktion der Harnstoffsynthese durch Induktion der Carbamylphosphat-Synthetase) stimuliert.

Bei den Hepatozyten von Ratte und Mensch erfolgten die Induktionsversuche nur in den Primärkulturen, da keine Subkulturen etabliert werden konnten. Dem Nährmedium wurden 50 µM β-Naphthoflavon (in DMSO) bzw. 50 µM CPT-cAMP in Kombination mit 1 mM Ammoniumchlorid zugesetzt. Die Zellen wurden permanent entweder ab dem Tag der Zellisolierung (Tag 0) oder ab dem vierten Kulturtag stimuliert. Die Bestimmung von CYP1A1-Aktivität und Harnstoffsynthese erfolgte, wie zuvor beschrieben. Als Vehikelkontrolle wurden die Zellen mit DMSO kultiviert. Das CPT-cAMP wurde im Kulturmedium gelöst, es wurde daher keine gesonderte Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

Bei den Hepatozyten vom Schwein wurden die Versuche modifiziert. Die Assays erfolgten hier auch in den Subkulturen. Die Zellen wurden ebenfalls permanent ab dem Tag 0 und zusätzlich noch am Tag 2 und Tag 5 der Kultur, dann jedoch nur für 24 h, induziert. Die CYP1A1-Aktivität und die Harnstoffsyntheserate wurden jeweils an den Tagen 1, 3 und 6 der Zellkultur bestimmt.

2.2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.2.8.1 Gewinnung des Gesamtproteins

Das Nährmedium wurde von den Zellen abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gespült. Pro 10 cm-Kulturschale wurden 500 µl Immunpräzipitationspuffer (IPP) eingesetzt. Der Puffer wurde auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden

mit einem Zellschaber abgeschabt, das Zelllysate mit einer 1000 µl Eppendorf-Pipette mehrmals auf- und abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.8.2 Bestimmung des Proteingehalts mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA)

Im alkalischen pH-Bereich werden Kupfer(II)-Ionen durch reduktive Gruppen der Proteinseitenketten zu Kupfer(I)-Ionen reduziert (Biuret-Reaktion). Das BCA-Reagenz bildet mit den Kupfer(I)-Ionen einen blau-violetten Komplex, dessen Absorption bei 655 nm gemessen werden kann.

Die Proteinextrakte wurden auf Eis aufgetaut, 20 min bei 13.000 U/min, 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden alle Proben 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Bestimmung erfolgte im Doppelansatz. In eine Mikrotiterplatte wurden jeweils 10 µl der verdünnten Proben vorgelegt und mit 200 µl BCA Working Solution (bestehend aus 50 Teilen BCA-Reagenz und 1 Teil Kupfer(II)-sulfat-Lösung) versetzt. Die Ansätze wurden 20 min bei 37°C inkubiert und die Absorption in einem Mikroplattenreader (Benchmark, BIO-RAD) bei 655 nm gemessen. Als Referenz wurde ein BSA-Standard mit bekannter Konzentration mitgeführt.

2.2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Man erreicht dies, indem man die Proteine mit Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (SDS) kocht. Dabei spaltet Mercaptoethanol Disulfidbrücken, das Protein wird denaturiert. Das anionische SDS bindet in konstantem Verhältnis an die Proteine, wodurch der SDS-Protein-Komplex eine negative elektrische Ladung erhält. Die Beweglichkeit der Proteine im elektrischen Feld hängt dann nur noch vom Molekulargewicht ab.

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Jeweils 40 µg Gesamtprotein wurden mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden auf das Sammelgel (9%ig) aufgetragen und die Elektrophorese bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Stromstärke betrug bis zum Erreichen des Trenngels (12%ig) zunächst 19 mA, dann wurde für die eigentliche Auftrennung der Proteine auf 35 mA erhöht. Jeweils 2 µl Rainbow-Marker wurden als Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

2.2.8.4 Western Blot

Western Blots dienen dem Nachweis von spezifischen Proteinen durch Antigen-Antikörper-Reaktionen. Nach der elektrophoretischen Trennung werden die Proteine auf eine geeignete Membran (z.B. Nylon oder Nitrozellulose) transferiert. Nach Inkubation mit einem gegen das gesuchte Protein spezifischen primären Antikörper wird in einem zweiten Schritt ein sekundärer Antikörper auf die Membran gegeben, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Über eine Farb- bzw. Lichtreaktionen ermöglicht der sekundäre Antikörper die Detektion des gesuchten Proteins.

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel zweimal je 10 min in Transferpuffer gewaschen. Die Proteine wurden bei 250 mA über Nacht auf eine PVDF-Membran (Immobilon[®] P, Millipore) transferiert und die Stromstärke 30 min vor Beendigung des Blotvorgangs auf 500 mA erhöht. Zur visuellen Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran für 2 min in Ponceau S-Rot gefärbt und anschließend in 10%iger Essigsäure entfärbt. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden auf einem Orbitalshaker und bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde für 1 h in 5%igem Blotto geschwenkt, um alle unspezifischen Proteinbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde der primäre Antikörper (anti-CK18: 1:200, anti-CX32: 1:1500, anti-PCK1: 1:500, anti-CYP1A1: 1:1000, anti-CPS I: 1:400) in 5%igem Blotto verdünnt und die Membran darin für 2 h inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 5 min in 1%igem Blotto gewaschen. Die verwendeten sekundären Antikörper waren Peroxidase-markiert (CK18: anti-Maus IgG, 1:2500; CX32: anti-Kaninchen IgG, 1:2500; PCK1: anti-Kaninchen IgG, 1:5000, CYP1A1: anti-Ziegen IgG, 1:10000, CPS I: anti-Ziegen IgG, 1:7500). Sie wurden in 1%igem Blotto verdünnt und die Membranen für 1 h darin inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 10 min in 1x Blotto gewaschen. Zur Antigendetektion wurde die PVDF-Membran für 1 min in ECL-Lösung geschwenkt. In einer Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm[®], Amersham Biosciences) auf die Membran gelegt. In Abhängigkeit vom nachzuweisenden Antigen wurde der Röntgenfilm 3 bzw. 5 min oder 15 h belichtet.

Zur Prüfung eines gleichmäßigen Proteinauftrags wurden die bereits beprobten Membranen einer Behandlung unterzogen, die sämtliche Proteine der Blockierungslösung sowie primären und sekundären Antikörper entfernen sollte. Damit verblieben noch genau jene Proteine auf der Membran, die zuvor durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Blotting auf die Membran transferiert wurden. Als sogenannte Ladekontrolle wurde Actin detektiert. Dazu wurden die PVDF-Membranen nach Entwicklung der Röntgenfilme nochmals mit Methanol aktiviert, in dest. Wasser gespült und für 1 h bei Raumtemperatur in 4 ml

Restore Western Blot Stripping Buffer inkubiert. Die Membranen wurden blockiert. Der primäre Antikörper (anti Actin) wurde 1:5000 verdünnt und die Membran für 2 h darin inkubiert. Der sekundäre Antikörper (anti-Maus IgG, POD-konjugiert) wurde in einer 1:50000-Verdünnung eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 h. Alle weiteren Schritte wurden, wie zuvor beschrieben, durchgeführt.

2.2.8.5 Immuncytochemie

Zusätzlich zu den PCR- und Western Blot-Analysen wurden immuncytochemische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 4 cm-Schalen (PCK1, CK18, CX32) bzw. auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen (α SMA, Desmin, anti-human hepatocyte, CYP1A1, CPS I) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Schälchen/Deckgläschen entsprechend dem zu detektierenden Antigen fixiert.

PCK1, CK18, CX32

Am Tag der Präparation (2 h nach dem Ausplattieren) sowie am Tag 7 der Kultur wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die PCK1-Färbung wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd (4%ig in PBS, pH 7,4) und anschließend weitere 30 min bei -20°C mit 70%igem Ethanol fixiert. Für die CK18- und die CX32-Färbung wurden die Zellen 5 min bei -20°C mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (1+1) fixiert. Die fixierten Zellen wurden luftgetrocknet, die Kulturschälchen mit Parafilm verschlossen und bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Zur Rehydrierung wurden die Kulturschälchen zweimal mit 50 mM Tris gewaschen. Endogene Peroxidasen wurden durch 15 minütige Inkubation mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid (in Methanol) inaktiviert. Die Kulturschälchen wurden zweimal mit Tris gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,3% Triton X-100 (in Tris) inkubiert. Anschließend wurde für weitere 30 min bei 37°C mit Proteinase K inkubiert.

Die primären Antikörper wurden in ChemMate[®] Antibody Diluent verdünnt (anti-PCK1: 1:20, anti-CK18: 1:100, anti-CX32: 1:5000) und über Nacht (17 h) bei 4°C auf den Zellen inkubiert. Die Kulturschälchen wurden zweimal mit 50 mM Tris gewaschen. Die sekundären Antikörper (für PCK1 und CX32: Dako EnVision⁺ System-HRP, anti-Kaninchen sowie für CK18: Dako EnVision⁺ System -HRP, anti-Maus) wurden für 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Die Kulturschälchen wurden danach zweimal mit Tris gewaschen. Zur Visualisierung der Antigene wurde AEC-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur auf den

Zellen inkubiert. Abschließend wurden die Schälchen mit dest. Wasser gespült und die Zellen mit Hematoxylin gegengefärbt.

CYP1A1 und CPS I

Zwei Stunden nach dem Ausplattieren sowie nach 8 Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und anschließend mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (1+1) für 20 min bei -20°C fixiert. Die Zellen wurden luftgetrocknet und bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zur Rehydrierung wurden die Zellen zweimal mit 50 mM Tris gewaschen. Dann wurde zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen zunächst für 1 h bei Raumtemperatur mit 0,5% Tween 20 (in PBS), 1 h mit 5% BSA (in PBS) sowie weitere 10 min mit Dako Protein block serum-free-Lösung inkubiert. Die Primärantikörper wurden in DAKO Antibody Diluent verdünnt (anti-CYP1A1: 1:100, anti-CPS I: 1:200) und bei 4°C über Nacht (17 h) auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min mit PBS gespült und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem 1:2500 in DAKO Antibody Diluent verdünnten Sekundärantikörper (anti-Ziegen IgG, Alexa Fluor 488 konjugiert) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal für 10 min mit PBS gespült und dann mit DAPI Vectashield® eingedeckt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde.

Co-Lokalisation von Desmin und α SMA

Am dritten und achten Kulturtag wurden die Deckgläschen aus den Kulturschalen entnommen und zweimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (1+1) für 20 min bei -20°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden luftgetrocknet und bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zur Rehydrierung wurden die Zellen zweimal mit 50 mM Tris gewaschen. Nachfolgend wurde zweimal mit PBS gespült. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Zellen 2 h bei Raumtemperatur mit 5% BSA + 0,5% Tween 20 (in PBS) inkubiert.

Die primären Antikörper wurden in der Blockierungslösung verdünnt (anti-Desmin: 1:200, anti- α SMA: 1:150). Zunächst wurde der anti-Desmin-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit der Blockierungslösung gespült und danach wurde der anti- α SMA-Antikörper ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit 1% BSA (in PBS) gespült. Für die Doppelfärbung wurde zunächst der 1:900 verdünnte (PBS+1% BSA) anti-Maus IgG-Antikörper, Cy3-konjugiert lichtgeschützt für 45 min bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert (Desmin-Färbung). Die Zellen wurden 10 min mit PBS (+1% BSA) gewaschen und dann mit dem 1:1200 verdünnten (PBS+1% BSA) sekundären Antikörper

(anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert) lichtgeschützt für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert (α SMA-Färbung). Im Anschluss wurden die Zellen zweimal für 10 min in PBS gewaschen. Fluorescent Mounting Medium wurde 1:1000 mit DAPI versetzt und zum Eindecken der Zellen verwendet.

Als Negativkontrolle dienten Kulturen, bei denen die primären Antikörper weggelassen wurden. Als Positivkontrolle wurden Kulturen von Nichtparenchymzellen am dritten und achten Kulturtag gefärbt.

Co-Lokalisation von anti-human hepatocyte und α SMA

Am dritten und achten Kulturtag wurden die Deckgläschen aus den Kulturschalen entnommen und zweimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (1+1) für 20 min bei -20°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden luftgetrocknet und bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zur Rehydrierung wurden die Zellen mit 50 mM Tris gewaschen. Nachfolgend wurde zweimal mit PBS gespült. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Zellen 2 h bei Raumtemperatur mit 5% BSA + 0,5 Tween 20 (in PBS) inkubiert.

Die primären Antikörper wurden in der Blockierungslösung verdünnt (anti- α SMA: 1:150, anti-human hepatocyte: 1:50). Zunächst wurde der anti-human hepatocyte Antikörper für 45 min bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit der Blockierungslösung gespült und dann wurde der anti- α SMA-Antikörper ebenfalls für 45 min bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit 1% BSA in PBS gewaschen. Für die Doppelfärbung wurde zunächst der 1:900 verdünnte anti-Maus IgG-Antikörper, Cy3-konjugiert lichtgeschützt für 45 min bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert (Hepatozyten-Färbung). Die Zellen wurden für 10 min in PBS (1% BSA) gewaschen. Dann wurde der 1:1200 in PBS (+ 1% BSA) verdünnte sekundäre Antikörper (anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert) lichtgeschützt ebenfalls für 45 min bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert (α SMA-Färbung). Abschließend wurden die Zellen zweimal für 10 min in PBS gewaschen. Fluorescent Mounting Medium wurde 1:1000 mit DAPI versetzt und zum Eindecken der Zellen verwendet.

Als Negativkontrolle dienten Kulturen, bei denen die primären Antikörper weggelassen wurden. Als Positivkontrolle wurden Kulturen von Hepatozyten und Nichtparenchymzellen am dritten und achten Kulturtag gefärbt.

2.2.8.6 Immunhistochemie

Von den eingefrorenen Leberstücken wurden mit einem Gefriermikrotom (Typ: MEV, Slee) Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und entsprechend dem nachzuweisenden Antigen behandelt.

Co-Lokalisation von CD26 und CK18

Der anti-CD26-Antikörper erkennt spezifisch die transplantierten CD26⁺-Zellen im ansonsten CD26⁻-Hintergrund der Empfängerleber (siehe auch Abschnitt 2.2.10). Zur Co-Lokalisation von CD26 und CK18 wurden zwei Antikörper aus der Maus eingesetzt. Daher war ein spezielles Protokoll zur Vermeidung von Kreuzreaktionen erforderlich. Zunächst wurde die Färbung für CK18 durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Aceton-Methanol (1+1) fixiert, für 2 h bei Raumtemperatur mit dem anti-CK18-Antikörper (1:200 in Tris) inkubiert, dann dreimal mit Tris gewaschen und weiter mit einem anti-Maus-IgG-Antikörper (Alexa Fluor 488-konjugiert) lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte die CD26-Detektion. Die Schnitte wurden dazu für 2 h bei Raumtemperatur mit dem 1:100 in Tris verdünnten anti-CD26-Antikörper (Isotyp 2a) inkubiert und nachfolgend dreimal in Tris gewaschen. Für die Fluoreszenzfärbungen wurde der Sekundärantikörper (anti-Maus IgG2a-Antikörper, Alexa Fluor 568-konjugiert) 1:400 in Tris (+10% Rattenserum) verdünnt, für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und danach für 1 h lichtgeschützt auf den Zellen inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum gewaschen und mit DAPI Vectashield[®] eingedeckt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde.

Co-Lokalisation von CD26 und CX32

Die Kryoschnitte wurden in Aceton fixiert und luftgetrocknet. Die Schnitte wurden dreimal mit 50 mM Tris gewaschen und mit 5% Ziegen Serum (in 50 mM Tris) für 20 min bei Raumtemperatur blockiert. Überschüssiges Serum wurde durch Abklopfen entfernt. Die Schnitte wurden dann für 2 h bei Raumtemperatur mit dem 1:100 in Tris verdünnten anti-CD26-Antikörper (Isotyp 2a) inkubiert und anschließend dreimal in Tris gewaschen. Für die Fluoreszenzfärbungen wurde der Sekundärantikörper (anti-Maus IgG2a-Antikörper, Alexa Fluor 568-konjugiert) 1:400 in Tris + 10% Rattenserum verdünnt, für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und danach für 1 h lichtgeschützt auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden in Tris gewaschen und bei 4° C über Nacht (17 h) mit dem polyklonalen anti-CX32-Antikörper (1:500 in Tris) inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal mit Tris gewaschen und lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur mit dem 1:400 in Tris verdünnten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Alexa Fluor 488-konjugiert) inkubiert. Nach dem Waschen

der Schnitte wurde schließlich mit DAPI Vectashield® eingedeckt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde.

Co-Lokalisation von CD26 und PCK1

Die Co-Lokalisation von CD26 und PCK1 wurde an Serienschnitten durchgeführt.

Die CD26-Färbung erfolgte, wie zuvor beschrieben, jedoch wurde als Sekundärantikörper das Dako EnVision⁺ System-HRP, anti-Maus verwendet. Die Schnitte wurden zweimal mit Tris gewaschen. Als Substrat zur Farbentwicklung diente AEC. Die Zellkerne wurden mit Hematoxylin gegengefärbt und die Schnitte eingedeckt. Als Negativkontrolle wurden Leberschnitte von CD26⁻-Ratten mitgeführt.

Für die PCK1-Färbung wurden die Gefrierschnitte in 4%igem Paraformaldehyd (in PBS) fixiert, mit 5%iger Target Retrieval Solution überschichtet und für 20 min erhitzt. Endogene Peroxidasen wurden mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid blockiert. Die Schnitte wurden über Nacht (17 h) bei 4°C mit dem anti-PCK1-Antikörper (1:25 in Tris) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit Tris gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Dako EnVision⁺ System-HRP, anti-Kaninchen) wurde für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Danach wurden die Schnitte gewaschen. Als Substrat zur Farbentwicklung diente AEC. Die Zellkerne wurden mit Hematoxylin gegengefärbt, anschließend wurden die Schnitt eingedeckt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde.

2.2.8.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die mit Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern gefärbten Schnitte wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Zeiss AxioScope) unter Verwendung der Rhodamin-, FITC- und UV-Filter ausgewertet. Für jeden Filter wurden von dem gleichen Gesichtsfeld fotografische Aufnahmen gemacht und unter Nutzung der Software Adobe® Photoshop® 7.0 digital übereinander gelegt. Die Überlagerung von roter und grüner Fluoreszenz resultiert in einer gelben Färbung und bedeutet eine Co-Lokalisation der detektierten Antigene.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Fluoreszenz-gefärbten Zellkulturen wurden an einem Nikon Eclipse E600-Mikroskop erstellt. Dabei wurden für jedes Gesichtsfeld unter Verwendung der UV-, FITC- und TRITC-Filter mikroskopische Aufnahmen gemacht und mit Hilfe der Steuerungs- und Auswertesoftware Lucia G Version 4.82 digital übereinander gelegt. Die Überlagerung von roter und grüner Fluoreszenz resultiert in einer gelben Färbung und bedeutet eine Co-Lokalisation der detektierten Antigene.

2.2.9 Methoden zur Isolierung und Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.9.1 Zellyse mit TRIzol®

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gespült. Zur Lyse wurde auf die Zellen in einer 10 cm-Kulturschale 1 ml TRIzol® gegeben. Das TRIzol® wurde auf die Zellen pipettiert, unter Schwenken gleichmäßig verteilt und zur Dissoziation der Nukleinsäure-Protein-Komplexe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt. Das TRIzol®-Lysat wurde mit einer 1000 µl Eppendorf-Pipette mehrmals auf- und abpipettiert. Alle Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.9.2 Isolierung der RNA aus den Zellysaten

Die Gesamt-RNA wurde nach einer modifizierten Methode (Chomczynski *et al.* 1987) mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert.

Die TRIzol®-Lysate wurden auf Eis aufgetaut, mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 s über Kopf geschwenkt. Die Proben wurden 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 15 min bei 11.000 U/min, 4°C zentrifugiert, wobei es zur Trennung von wässriger und organischer Phase kam. Die wässrige, RNA-enhaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein Eppendorftube überführt. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl Isopropanol zugesetzt, kurz über Kopf geschwenkt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden 10 min bei 11.000 U/min, 4°C zentrifugiert. Ein gelartiges Pellet entstand. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Es wurde 1 ml 75%iges Ethanol (in DEPC-Wasser) zugefügt und das Tube über Kopf geschwenkt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 9.000 U/min, 4°C) wurde der Überstand komplett entfernt und das entstandene Pellet kurz luftgetrocknet. Je nach Größe wurde das Pellet in 20-40 µl DEPC-Wasser gelöst. Der RNA-Gehalt wurde mittels Spektrophotometer (Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences) durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) ermittelt. Dazu wurden Aliquote der Proben mit DEPC-Wasser so verdünnt, dass die gemessenen Extinktionen zwischen 0,3 und 0,6 lagen. Eine OD_{260} von 1 entspricht 40 µg/µl RNA. Aus nachfolgender Gleichung konnte die RNA-Konzentration berechnet werden:

$$C_{RNA} [\mu\text{g} / \mu\text{l}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g} / \mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Quotient der gemessenen Absorptionen bei 260 nm (Nukleinsäure) und bei 280 nm (Proteine) diente als Maß für die Reinheit der Präparation. Dieser Quotient lag in der Regel zwischen 1,7 und 2. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.9.3 DNase I-Behandlung

In Vorversuchen⁴ zeigte sich, dass bei der RNA-Isolierung aus TRIzol[®]-Lysaten Spuren genomischer DNA in der isolierten RNA enthalten sein können. Deshalb wurden alle RNA-Proben mit DNase I (RNase-frei, MBI Fermentas) behandelt, um diese Kontamination zu eliminieren und falsch positive PCR-Ergebnisse zu vermeiden. Dazu wurde je 1 µg Gesamt-RNA in 7,6 µl DEPC-H₂O aufgenommen, mit 1 µl 10x-Reaktionspuffer, 0,4 µl RNase OUT[®] (40 U/µl) und 1 µl DNase I (1 U/µl) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 1,5 µl EDTA (25 mM) zugegeben und die Ansätze für 10 min bei 65°C inkubiert, um die DNase I zu inaktivieren.

2.2.9.4 cDNA-Synthese (RT-PCR)

Mit Hilfe einer RT-PCR wird RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Dabei können Random-Primer oder auch oligo(dT)-Primer verwendet werden, wobei letztere den Vorteil haben, dass sie sich an der poly A-Sequenz der mRNA anlagern. Durch die reverse Transkriptase wird somit ausschließlich die Information der mRNA (Gentranskripte) in eine cDNA-Sequenz übersetzt. Je nach verwendeter reverser Transkriptase ist das Resultat einer solchen RT-PCR entweder ein Hybrid aus einem RNA- und einem DNA-Strang oder aber ein einzelner DNA-Strang. In jedem Fall dient der DNA-Strang als Matrize für nachfolgende PCR-Reaktionen.

Für die reverse Transkription wurden jeweils 10 µl aus den Ansätzen nach der DNase I-Behandlung entnommen und in einem Mastercycler[®] gradient (Eppendorf) für 10 min bei 70°C denaturiert. Danach wurden die Ansätze auf Eis gekühlt. Je Probe wurden 1 µl Random-Primer, 5 µl 5x-Reaktionspuffer, 0,5 µl RNase OUT[®], 2 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM) sowie 0,3 µl M-MLV reverser Transkriptase (200 U/µl) für die cDNA-Synthese eingesetzt, wobei entsprechend der Probenanzahl ein Mastermix hergestellt wurde. Zu der denaturierten RNA wurden 15 µl des Mastermixes pipettiert, die Ansätze wurden vorsichtig gemischt, leicht anzentrifugiert und für 45 min bei 42°C inkubiert.

⁴ PCR mit Primern für GAPDH, TRIzol[®]-isolierte RNA anstelle cDNA als Template

Abschließend erfolgte eine Inaktivierung für 3 min bei 95°C. Die cDNA wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.9.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch PCR (Polymerase Chain Reaction) können DNA-Abschnitte selektiv vermehrt werden. Die Sequenz und Länge des PCR-Produkts wird dabei durch die verwendeten Primer bestimmt. Für diese Reaktion kommen hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien zum Einsatz. Diese Polymerasen bleiben auch nach mehrfachem Erhitzen auf 95°C noch aktiv. Als Matrize kann chromosomale DNA, isolierte Plasmid-DNA oder cDNA dienen. In einem ersten Schritt (Denaturierung) wird durch Erhitzen auf 95°C die ggf. doppelsträngige DNA oder RNA/DNA-Hybride denaturiert und eine einzelsträngige DNA generiert. Darauf folgt das Anlagern der Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing). Die Temperatur hängt dabei von der Länge der Primer und deren GC-Gehalt ab. Die Primer dienen als Startpunkte für die Synthese eines neuen DNA-Stranges. Im dritten Schritt (Elongation) verknüpft die Polymerase nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung einzelne Nukleotide und vervollständigt so die anfangs nur im Bereich der angelagerten Primer doppelsträngige DNA. Der Zyklus kann jetzt mit einer weiteren Denaturierung erneut beginnen und mehrfach wiederholt werden.

Für die PCR wurden je Ansatz 12,5 µl 2x PCR-Mastermix, 10,5 µl Nuklease-freies Wasser, 1 µl cDNA sowie je 0,5 µl Sense- und Antisense-Primer (je 25 pmol/µl) eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Mastercycler[®] gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die Annealingtemperaturen und die Anzahl der Zyklen (vgl. Tabelle 4 im Anhang) wurden vorab optimiert. Zur Kontrolle gleicher Ausgangsmengen an cDNA wurde eine PCR für ein Housekeeping-Gen (GAPDH bzw. 18S-RNA⁵) durchgeführt.

Für die Bestätigung der Microarray-Analysen durch PCR wurde aufgrund der limitierten Ausgangsmengen der RNA aus den Ovalzellpräparationen eine leicht abgewandelte Verfahrensweise gewählt. Dazu wurden, wie oben beschrieben, die PCR-Reaktionen angesetzt und durchgeführt. Es wurde jedoch nur für 10 Zyklen amplifiziert. Jeweils 1 µl aus dieser Erst-PCR diente als Template für eine zweite PCR. Damit stand ausreichend Material zur Verfügung, die Ergebnisse der Microarrays durch PCR zu prüfen. In Tabelle 4 erfolgte die Angabe der entsprechenden Zyklenzahlen in diesen Fällen als 10+x, wobei „x“ in Vorversuchen ermittelt wurde. Zur Überprüfung, dass die durchgeführten PCR-Reaktionen im

⁵ Für die 18S-PCR wurde die cDNA 1:10 mit dest. Wasser verdünnt.

exponentiellen Bereich erfolgten, wurden jeweils noch PCR-Reaktionen mit „10+(x-3)“ bzw. „10+(x+3)“ Zyklen durchgeführt. In Tabelle 3 wurde jedoch nur die aussagekräftigste Zyklenzahl dargestellt. Nach der PCR wurden die Proben elektrophoretisch über ein 2%iges Agarosegel getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem (GeneGenius, Syngene) ausgewertet.

2.2.10 Hepatozytentransplantation⁶

Das verwendete Transplantationsmodell beruht auf einer natürlichen Mutation der Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV = CD26) der Empfänger-Ratten, die als Folge dieser Mutation dieses Enzym nicht exprimieren. Werden Hepatozyten aus Wildtyp-Tieren isoliert und zur Transplantation verwendet, sind diese CD26⁺-Hepatozyten leicht von den endogenen, CD26⁻-Hepatozyten zu unterscheiden.

Voraussetzung für eine effektive Besiedelung einer Empfängerleber durch transplantierte Hepatozyten ist ein Wachstumsstimulus in der Empfängerleber und ein Wachstumsvorteil der zu transplantierenden Zellen gegenüber den Hepatozyten der Wirtsleber. Letzterer wurde durch Vorbehandlung der Empfängertiere sechs und vier Wochen vor der Transplantation mit 30 mg/kg Körpergewicht Retrorsin erreicht, die die Proliferation der endogenen Hepatozyten hemmte und den nicht vorbehandelten, transplantierten Hepatozyten einen Proliferationsvorteil verschaffte. Zur Induktion eines Wachstumsstimulus wurden alle Empfängertiere unmittelbar vor der Transplantation einer 1/3 Hepatektomie unterzogen. Wildtyp Fischer F-344-Ratten (Charles River) dienten als Spender für die Hepatozyten. Die Zellen wurden, wie im Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, isoliert und anschließend vier bzw. sieben Tage kultiviert. Unmittelbar vor der Transplantation wurden die Hepatozyten von den Kulturschalen abgelöst (siehe Abschnitt 2.2.6.3), die Kollagenase wurde dafür jedoch nur in 0,5-fach konzentriertem Trypsin/EDTA gelöst. Die Vitalität wurde durch Trypanblau-Ausschluss bestimmt und betrug mindestens 85%. Die zu transplantierenden Hepatozyten wurden in 100 µl PBS aufgenommen. Nach Narkotisierung der Empfängertiere wurden durchschnittlich $4,5 \times 10^6$ Zellen über eine Kanülierung der Pfortader appliziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Lebern entnommen und schockgefroren.

⁶ Die Hepatozytentransplantation sowie die damit verbundenen immunhisto- und immuncytochemischen Färbungen wurden in Kooperation mit Frau Dr. S. König und Frau Dr. P. Krause, Klinik und Poliklinik für Allgemeinchirurgie, Georg-August-Universität Göttingen, durchgeführt.

2.2.11 Gewinnung von Ovalzellen⁷

Zur Induktion der Ovalzellproliferation wurden Fischer F-334-Ratten (170-190 g) mit 2-Acetylaminfluoren (2-AAF) vorbehandelt. Das 2-AAF wurde in Sonnenblumenöl gelöst und zunächst über einen Zeitraum von vier Tagen in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht oral appliziert. Am 5. Tag wurde eine 2/3-Hepatektomie vorgenommen. Am 7. Tag wurde die 2-AAF-Behandlung wieder aufgenommen und für weitere vier Tage fortgesetzt. Danach erfolgte die Isolierung der Ovalzellen und deren Aufreinigung durch magnetic cell sorting (MACS).

Nach Narkotisierung der Tiere mit Pentobarbital wurde der Bauchraum eröffnet und die Portalvene kanüliert. Die Leber wurde ca. 15 min mit HBSS (Ca^{2+} , Mg^{2+} -frei, 20 ml/min) blutfrei gespült. Im Anschluss daran erfolgte eine 15-minütige Perfusion mit Kollagenasehaltigem Krebs-Ringer-Puffer (45 mg/ml Kollagenase Typ 1). Die Leber wurde entfernt, die Leberkapsel geöffnet und der Inhalt zum enzymatischen Nachverdau in 50 ml Krebs-Ringer-Puffer mit 50 mg Kollagenase Typ 1, 50 mg Pronase und 1 mg DNase I (Sigma-Aldrich) gegeben. Die Suspension wurde 30 min bei 37°C unter ständigem Rühren inkubiert und anschließend durch ein Nylonnetz (125 µm) filtriert. Die Zellen wurden zweimal in MEM gewaschen (10 min bei 1600 U/min, 4°C) und in MEM resuspendiert. Durch wiederholte Zentrifugation (3x 500 U/min, 5 min, 4°C) wurden die Hepatozyten von der Nichtparenchymzellfraktion, die auch die Ovalzellen enthielt, abgetrennt. Die Nichtparenchymzellen wurden bei 1000 U/min abzentrifugiert, in 2 ml S&M-Puffer resuspendiert und mit 75 µl Antikörper (anti-Ratte CD90, PE-konjugiert) versetzt. Die Zellen wurden lichtgeschützt 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden weitere 18 ml S&M-Puffer zugesetzt. Die Zellsuspension wurde mehrmals auf- und abpipettiert und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml S&M-Puffer resuspendiert und mit 200 µl anti-PE-Microbeads (Miltenyi Biotech) versetzt. Der Ansatz wurde lichtgeschützt 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von 18 ml S&M-Puffer wurden die Zellen mehrmals auf- und abpipettiert und 5 min bei 1000 U/min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml S&M-Puffer resuspendiert und die Suspension über eine Säule (MACS Column LS, Miltenyi Biotech) gegeben. Die Zellen wurden eluiert, und ein weiteres Mal über eine Säule aufgereinigt. Nach Elution wurden die Zellen in 2 ml TRIzol[®] lysiert. Die Zelllysate wurden bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

⁷ Die Induktion und Isolierung der Ovalzellen wurde in Kooperation mit Frau Dr. S. König und Frau Dr. P. Krause, Klinik und Poliklinik für Allgemein Chirurgie, Georg-August-Universität Göttingen, durchgeführt.

2.2.12 Microarray-Analysen⁸

Unterschiede im Genexpressionsmuster proliferierender und nicht-proliferierender Rattenhepatozytenkulturen wurden mit Hilfe von DNA-Microarrays (Ratten-10k-Array, MWG Biotech) untersucht. Von drei unabhängigen Zellpräparationen wurde mittels TRIzol[®] aus drei Tage (proliferierend) und acht Tage (nicht-proliferierend) alten Hepatozytenkulturen die RNA geerntet und, wie im Abschnitt 2.2.9.2 beschrieben, isoliert. Die Integrität der RNA wurde durch denaturierende Gelelektrophorese geprüft. Mittels reverser Transkriptase (SuperScript[®] II) und oligo(dT)₁₈-Primern wurde eine zur mRNA komplementäre DNA synthetisiert. Bei dieser reversen Transkription wurde für den Tag 3 Cy3-markiertes dCTP (desoxy-Cytidin-Triphosphat) und für den Tag 8 Cy5-markiertes dCTP verwendet. Cy3- und Cy5-markierte Nukleotide werden ggf. quantitativ unterschiedlich in die synthetisierte cDNA eingebaut (Yang *et al.* 2002), daher wurden die RNA-Proben für eine zweite Hybridisierung mit dem jeweils anderen Fluorochrom revers transkribiert. Durch diesen „Dye-Swap“ sollten die Effekte, welche auf die unterschiedlichen Einbauraten der markierten Nukleotide zurückzuführen sind, weitgehend ausgeglichen werden. Man erhält damit je Einzelexperiment zwei Ergebnisse je nach Richtung der Fluoreszenzmarkierung. Entsprechend den Empfehlungen des Array-Herstellers wurden die markierten Proben auf die Microarrays hybridisiert. Dabei wurden immer Proben vom Tag 3 mit Proben vom Tag 8 hybridisiert. Nach verschiedenen Waschschrritten wurden die Microarrays mit Hilfe eines konfokalen Laserscanners gescannt. Die Intensitäten der einzelnen Spots wurden dabei von der Analysesoftware ImaGene[®] (BioDiscovery) ausgewertet und mittels MAVI pro (MWG Biotech) weiterverarbeitet. Die Daten wurden auf die Gesamtintensität der jeweiligen Arrays normalisiert. Die Ausgabe der Daten erfolgte als Intensität der beiden einzelnen Kanäle je Spot sowie einem daraus berechneten Quotienten. Dieser Quotient (Ratio) diente als Maß für eine Up- oder Down-Regulation der einzelnen Gene. Bei nicht detektierbaren Spots wurde die Ratio für die betreffenden Microarrays mit „1“ angegeben (vgl. Tabelle 2). Für die Endauswertung wurde eine mittlere Ratio aus den sechs Einzelratios wie folgt berechnet: die Einzelratios wurden miteinander multipliziert und danach die n-te Wurzel berechnet, wobei „n“ die Anzahl der Einzelratios darstellt, die aus auswertbaren Spots (\neq „1“) resultierten.

⁸ Die Microarray-Analysen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. T. Böttger, Herrn Dr. V. Christov und Herrn Dr. Lehnich vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Bei den ermittelten Quotienten (Tag 3/Tag 8) bedeuten Werte kleiner 1 eine Up-Regulation, während Verhältnisse größer 1 eine Down-Regulation der betreffenden Gene in der statischen Phase der Zellkultur (Tag 8) anzeigen.

In einem weiteren Experiment wurde die *in vivo*-Genexpression von proliferierenden Ovalzellen und nicht-proliferierenden Hepatozyten untersucht. Aus jeweils drei unabhängigen Zellpräparationen wurde RNA von Ovalzellen und Hepatozyten gewonnen. Da nicht genügend Ovalzell-RNA für eine direkte reverse Transkription zur Verfügung stand, wurde die RNA als doppelsträngige DNA amplifiziert. Dazu wurde die SMART-Technologie (Switching Mechanism At the 5' end of the RNA Transcript) benutzt. Einen schematischen Überblick dazu gibt Abbildung 1. Die Methode basiert auf einer homologen Sequenz von ca. 20 Basen in allen verwendeten Primern. Mit Hilfe eines modifizierten oligo(dT)-RT Primers wurde zunächst Einzelstrang-cDNA synthetisiert. Die dazu verwendete reverse Transkriptase fügte beim Erreichen des 5'-Endes der mRNA 3-5 Nukleotide (vorwiegend dC) an die neu synthetisierte cDNA an. Mit diesem dC-Stretch hybridisierte dann der Guanodin-Stretch des sogenannten SMART Oligo, wodurch die eigentliche mRNA-Sequenz um genau die Länge des SMART Oligos verlängert wurde. Das derart verlängerte Template wurde anschließend komplett bis zum 5'-Ende des SMART Oligos revers transkribiert. Dadurch wurde eine einzelsträngige cDNA generiert, die jeweils die kompletten 3'- und 5'-Enden der mRNA enthielt. In einer zweiten PCR wurde ein PCR Primer verwendet, der aufgrund seiner Homologie zum SMART Oligo und RT Primer dafür sorgt, dass die Information der mRNA als doppelsträngige cDNA amplifiziert werden kann. Insgesamt wurde eine Amplifikation über 18 PCR-Zyklen durchgeführt. Die amplifizierte doppelsträngige cDNA wurde in einer dritten PCR unter Verwendung des Klenow-Fragmentes⁹ in Kombination mit Random-Primern und Cy3- bzw. Cy5-konjugiertem dCTP markiert. Dye-Swap, Hybridisierung auf die Arrays und Auswertung erfolgten analog dem ersten Microarray-Experiment.

⁹ Peptid-Abschnitt der DNA Polymerase 1 aus *Escherichia coli*

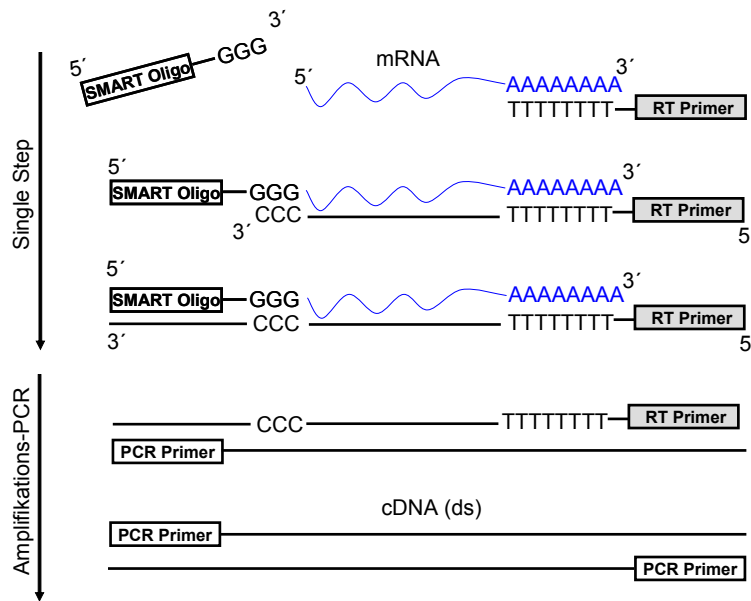


Abbildung 1: Schematische Darstellung der SMART-Amplifikation

2.2.13 Klonierung von Fox m1b in den pIRES2-EGFP Vektor

Aus der Literatur ist eine Reihe von Genen bekannt, die die Proliferation regulieren. Darunter findet sich auch das Gen für den Transkriptionsfaktor Fox m1. Als Zielgene von Fox m1 wurden verschiedene Cycline sowie weitere Zellzyklus-regulierende Proteine identifiziert (Costa 2005, Wang *et al.* 2001). Fox m1 konnte in jeder bisher untersuchten, proliferierenden Zelle nachgewiesen werden (Costa *et al.* 2003, Ye *et al.* 1999, Okabe *et al.* 2001, Pilarsky *et al.* 2004). Sein Einfluss auf die Proliferation konnte unter Anwendung von siRNA-Techniken und Generierung von Knock out-Mäuse gezeigt werden.

Ausgehend von einem Plasmid¹⁰, welches das Gen für den humanen Transkriptionsfaktor Fox m1b (homolog zum Fox m1 der Ratte) enthielt, wurde die codierende Sequenz per PCR in 36 Zyklen amplifiziert. Dazu wurden eine proof-reading Polymerase (Pfu-Polymerase) sowie Primer mit einer Schnittstelle für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* verwendet. Das PCR-Produkt wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mittels Gelelektionskit eluiert. Die eluierte DNA (2,4 µg) wurde über Nacht (17 h) bei 16°C mit *BamHI* inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt (Kaliumacetat-Fällung) und über Nacht (17 h) bei 16°C mit *EcoRI* inkubiert. Nach diesem Restriktionsverdau wurde die DNA

¹⁰ Das Plasmid wurde von Herrn R. Costa, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, College of Medicine, University of Illinois zur Verfügung gestellt.

nochmals gefällt und in dest. Wasser aufgenommen. Damit stand das Insert für eine Ligation zur Verfügung.

Das Insert sollte in den pIRES2-EGFP Vektor (BD Clontech) kloniert werden. Dieser Vektor erlaubt die gleichzeitige Expression des ausgewählten Transgens und eines Reportergens (EGFP). Damit wird es möglich, die transfizierten Zellen optisch von nicht-transfizierten Zellen zu unterscheiden. Zunächst wurde eine ausreichende Menge des Vektors präpariert. Der Vektor wurde analog dem Insert einem sequentiellen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BamHI* unterzogen. Nach dem Verdau erfolgte eine Dephosphorylierung durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (CIAP).

Bei der Ligation wurden Insert und Vektor im molekularen Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Zur Amplifizierung des Fox m1b-pIRES-EGFP-Plasmids wurden kompetente Zellen (JM109, Promega) mit diesem Plasmid transformiert. Die kompetenten Zellen wurden auf Kanamycin-haltigen Agarplatten (25 µg/ml) ausplattiert und für 15 h bei 37°C inkubiert. Von diesen Selektions-Platten wurden Klone gepickt und über Nacht-Kulturen angelegt. Von diesen Kulturen wurden dann 200 µl abgenommen, die Zellen abzentrifugiert. Bis auf etwa 20 µl wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in dem verbleibenden Überstand durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach Zusatz von 10 µl 6x Blaupuffer und 10 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCIA) wurden die Ansätze gut gemischt und bei 13.000 U/min zentrifugiert. Dabei kommt es zur Trennung von wässriger und organischer Phase. Aus der oberen wässrigen Phase wurden 10 µl abgenommen und direkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung und Anfärben mit Ethidiumbromid konnte grob differenziert werden, welche der gepickten Klone das gewünschte Plasmid enthielten. Es wurden zwei Klone ausgewählt und davon 50 ml-Kulturen (LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin) angeimpft und für 18 h bei 37°C in einem Bakterien-schüttler inkubiert. Unter Verwendung eines Plasmidpräparationskits wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers die Plasmidpräparation durchgeführt. Durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BamHI* wurde geprüft, ob das Insert wieder ausgeschnitten werden konnte. Die zwei ausgewählten Klone wurden zur Transfektion von Rattenhepatozyten eingesetzt und parallel dazu sequenziert.

2.2.14 Transfektion mit dem Fox m1b-pIRES-EGFP-Plasmid (Fox-GFP)

Unter Verwendung des Effectene Transfection Reagent (Qiagen) wurden 24 h alte Kulturen von Rattenhepatozyten mit dem Fox-GFP-Konstrukt transfiziert. Dazu wurden verschiedene Mengen von Plasmid-DNA (400, 800 und 1200 ng) getestet, die jeweils im Verhältnis von

1:10 mit dem Transfektionsreagens vermischt wurden. Das Effectene-DNA-Gemisch wurde für 1 h bei Raumtemperatur in HGM inkubiert und anschließend für 17 h auf die Zellen gegeben. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Die Hepatozyten wurden, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, kultiviert. Die Kulturen wurden regelmäßig auf die Transgen-/Reportergen-Expression hin untersucht.

2.2.15 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen¹¹

Mit der Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen sollte geprüft werden, ob es im Verlauf der Zellkultur zu einer Deposition von extrazellulärer Matrix auf den kultivierten Rattenhepatozyten kommt. Dazu wurden die Zellen auf kollagenbeschichteten Deckgläschen ausplattiert und, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, kultiviert. Am Tag drei bzw. acht der Zellkultur wurden die Deckgläschen aus den 6-Well-Platten entnommen, mit PBS gewaschen und in 2%igem Glutardialdehyd (in PBS) für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen 1 h in 1%iger Osmiumtetroxidlösung (in PBS) inkubiert und dann mit PBS gespült. Die Zellen wurden mittels aufsteigender Ethanolreihe (10, 30, 50, 70, 90, 100%) entwässert, indem sie jeweils für 10 min in den entsprechenden Lösungen inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen jeweils für 3 min in folgenden Lösungen inkubiert: Ethanol/Hexamethyldisilazan (HMDS) im Verhältnis 2:1, Ethanol/HMDS im Verhältnis 1:2, 100%iges HMDS. Nach dem Lufttrocknen wurde durch Sputtern eine 2-3 nm dicke Platinschicht aufgebracht und die REM-Aufnahmen angefertigt.

2.2.16 Tierexperimentelle Arbeiten

Die tierexperimentellen Arbeiten in Zusammenhang mit der Gewinnung von Hepatozyten zur Etablierung von Primärzellkulturen wurden beim Tierschutz-Beauftragten der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Ratte: AZ_K6A1, Schwein: AZ_K6M5) angezeigt und genehmigt.

2.2.17 Ethikvotum

Zur Isolierung von Hepatozyten aus humanen Leberresektaten und zur Durchführung von Hepatozytenkulturen lag ein positives Votum der Ethikkommission vor (Antrag vom 21.08.2002).

¹¹ Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Herrn Dipl.-Ing. A. Höß vom Fraunhofer-Institut für Werkstoffmechanik, Halle angefertigt.

2.2.18 Gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 (S1)

Alle gentechnischen Arbeiten wurden in einem unter AZ 66230-0255-4 beim Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt registrierten Labor im Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung (ZAMED) der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

2.2.19 Statistische Auswertung

Die ermittelten Messwerte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Unter Verwendung von MS Excel wurde mittels Student's t-Test geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messwerten vorlagen. Werte $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Einführende Anmerkungen

3.1.1 Proliferationsassays

Es gibt eine Vielzahl an Methoden, die zur Erfassung der Proliferation eukaryotischer Zellen eingesetzt werden können. Aus dieser Vielfalt wurde die Bestimmung des BrdU-Einbaus, des ATP- und DNA-Gehalts sowie der Zellzahl ausgewählt, um die Proliferation serumfrei kultivierter Hepatozyten zu charakterisieren. Die verwendeten Proliferationsassays beruhen auf der Messung von Lumineszenz bzw. Fluoreszenz, die Messwerte wurden daher als RLU (relative light units) angegeben und auf 10.000 Zellen bezogen. Zusätzlich wurde die Zellkultur durch mikroskopische Aufnahmen dokumentiert.

Die Zellzahl ist ein sehr verlässlicher Parameter, um die Proliferation von Zellen zu beschreiben. Durch einfaches Auszählen in einer Zählkammer kann exakt, schnell und kostengünstig eine Zu- oder Abnahme der Zellzahl ermittelt werden. In Verbindung mit der Zellzahlbestimmung liefert der BrdU-Einbau wichtige Informationen zur zeitlichen Dynamik der Proliferation von Zellen. Auch die Zunahme des DNA-Gehalts kann zur Beschreibung der Proliferation dienen. Somatische Zellen sind in der Regel diploid. Bei der Zellteilung verdoppelt sich der DNA-Gehalt in der Kulturschale und kann somit zur Erfassung der Zellproliferation genutzt werden. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist jedoch ein gleichbleibender Ploidiegrad der Zellen. Hepatozyten können aber abhängig vom Alter des Spenders sowie im Verlauf der Zellkultur andere Ploidiegrade aufweisen (Gupta 2000, Kudryavtsev *et al.* 1993), daher müssen die Ergebnisse basierend auf diesem Proliferationsassay kritisch analysiert werden. Die Proliferation von Zellen kann auch durch den Nachweis zellspezifischer Eigenschaften, wie z.B. dem zellulären ATP-Gehalt oder durch Stoffwechsellleistungen, z.B. im MTT-Assay, quantifiziert werden. Im verwendeten CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay wird ATP detektiert, welches ausschließlich in vitalen, stoffwechselaktiven, nicht jedoch in toten Zellen vorkommt. Unter der Voraussetzung, dass der zelluläre ATP-Gehalt im Verlauf der Zellkultur konstant bleibt, kann die Proliferation über eine Zunahme des Gesamt-ATP-Gehalts bestimmt werden. Da der ATP-Gehalt im Kulturverlauf aber variieren kann, bedürfen auch die aus dem ATP-Assay gewonnenen Daten einer kritischen Betrachtung.

3.1.2 Funktionsassays

Auf die funktionelle Bedeutung der Leber wurde in der Einleitung bereits eingegangen. Eine ihrer Hauptaufgaben besteht darin, endogene Stoffwechselprodukte und exogene Xenobiotika zu entgiften. Sie verfügt dazu über eine Vielzahl von Enzymen. Die Aktivität einzelner Enzyme kann während der Zellkultur zur Beschreibung des hepatozytenspezifischen Charakters der kultivierten Zellen dienen. Zum Beispiel kann die Enzymaktivität der Cytochrome P450 1A1 (Ethoxyresorufin-O-Deethylase) und 2B1 (Pentoxoresorufin-O-Dealkylase) durch Umsatz ihrer spezifischen Substrate Ethoxyresorufin (EROD-Aktivität) bzw. Pentoxoresorufin (PROD-Aktivität) bestimmt werden.

Eine weitere hepatozytenspezifische Stoffwechselleistung ist die Umwandlung des im Verlauf des Proteinstoffwechsels entstehenden zelltoxischen Ammoniaks. Dieser wird durch Synthese von Harnstoff entgiftet und über die Nieren ausgeschieden. Insgesamt fünf sowohl mitochondrial als auch zytosolisch lokalisierte Enzyme sind an der Harnstoffsynthese beteiligt, wobei die Carbamylphosphat-Synthetase das Kontrollenzym der Harnstoffsynthese darstellt.

Die Kultur von Primärzellen, insbesondere unter proliferativen Bedingungen, ist häufig mit dem Verlust von zellspezifischen Funktionen verbunden. Dies, und die Frage, ob eventuelle Funktionsverluste durch geeignete Stimuli wieder herzustellen seien, sollte in den vorliegenden Untersuchungen geklärt werden.

3.2 Proliferation und Funktion humaner Hepatozyten

3.2.1 Proliferation humaner Hepatozyten

Während der 8-tägigen serumfreien Kultur humaner Hepatozyten blieb die Zellzahl konstant bei ca. 200.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte (Abbildung 2, rechts). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die Zellen mit fortschreitender Kultur ihre polygonale, regelmäßige Form verloren. Die Begrenzung der Zellen wurde immer unregelmäßiger, die Fläche der Zellen vergrößerte sich zunehmend, ein konfluenter Zellrasen entstand (Abbildung 2, links).

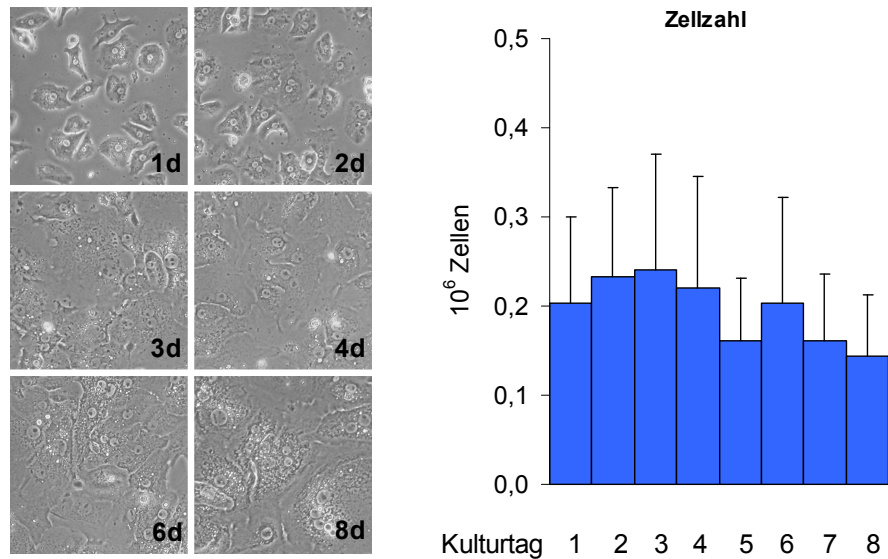


Abbildung 2: Zellzahlentwicklung während der 8-tägigen serumfreien Kultur primärer humaner Hepatozyten. Links: repräsentative Fotos der Zellkultur (Originalvergrößerung 100x), rechts: Zellzahl je Well der 6-Well-Platte. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ unabhängigen Zellpräparationen.

Der BrdU-Einbau stieg während der Zellkultur transient an, das Maximum wurde am Tag 3 der Zellkultur erreicht. Ab dem Tag 4 war nur noch ein basaler BrdU-Einbau zu beobachten (Abbildung 3, links). Dabei folgte auf das Maximum im BrdU-Einbau ein Anstieg des DNA-Gehalts. Der zelluläre DNA-Gehalt nahm während der Kultur zu. Nach acht Tagen in Kultur hatte sich der DNA-Gehalt etwa verdoppelt, dieser Anstieg war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 3, Mitte). Bei unveränderter Zellzahl lässt ein Anstieg des DNA-Gehalts pro Zelle auf Endomitosen schließen. Nach der S-Phase des Zellzyklus kommt es dabei nicht zu einer Zellteilung, wodurch sich der Ploidiegrad der kultivierten Hepatozyten während der Zellkultur erhöhte, die Zellzahl aber unverändert blieb. Parallel zum DNA-Gehalt nahm der zelluläre ATP-Gehalt im Verlauf der Zellkultur kontinuierlich zu. Nach acht Tagen hatte sich der ATP-Gehalt mehr als verdoppelt (Abbildung 3, rechts). Auch hier konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

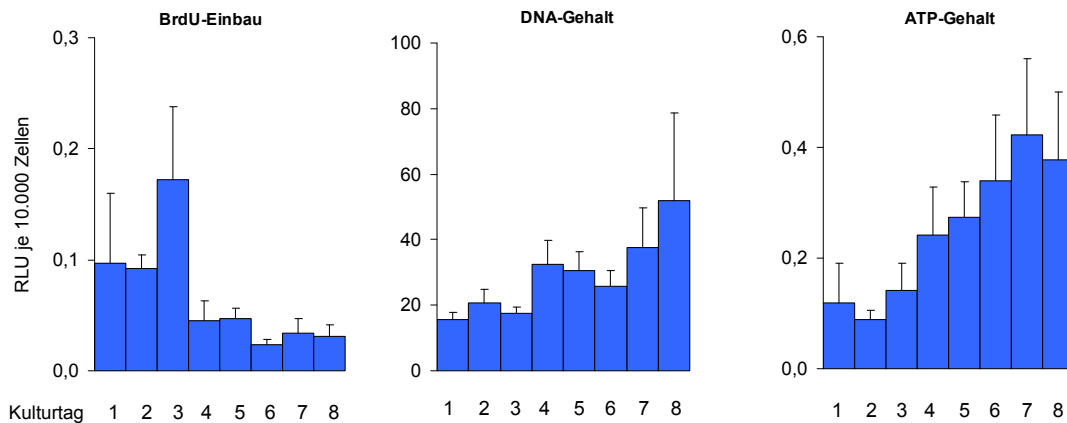


Abbildung 3: BrdU-Einbau, DNA- und ATP-Gehalt in serumfrei kultivierten, primären humanen Hepatozyten. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus n=3 unabhängigen Zellpräparationen.

Co-Kultur humaner Hepatozyten auf humanen Nichtparenchymzellen

In der Leber sind Nichtparenchymzellen (NPC) über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte wichtige Kommunikationspartner der Hepatozyten. Weiterhin stellen sie über parakrine Einflüsse durch Zytokine und Mediatoren wichtige Faktoren bereit, die für die Funktion der Hepatozyten maßgeblich sind. In der Hepatozytenprimärzellkultur fehlen diese Einflüsse der Nichtparenchymzellen. Daher ist es für bestimmte Fragestellungen sinnvoll, Co-Kulturen aus Hepatozyten und Nichtparenchymzellen zu etablieren.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten adulten humanen Hepatozyten konnten unter den normalen Kulturbedingungen *in vitro* nicht expandiert werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurden daher humane Hepatozyten auf einem Monolayer aus humanen Nichtparenchymzellen ausplattiert und, wie unter 2.2.2 beschrieben, kultiviert.

Am Tag 1 der Kultur wurde beobachtet, dass sich die Hepatozyten überwiegend in den Lücken des NPC-Monolayers angeheftet hatten. Obwohl die Plattierungsdichte der nicht markierter Hepatozyten anderer Versuchsansätze entsprach, hatten sich unerwartet wenig DiI-markierte Hepatozyten angeheftet. Nach drei Tagen in Kultur zeigten sich keinerlei Anzeichen für eine Proliferation der Hepatozyten. Auch nach 8-tägiger Zellkultur hatten sich die Hepatozyten nicht vermehrt, sie waren mehrheitlich apoptotisch und begannen, sich von der Unterlage abzulösen (Abbildung 4).

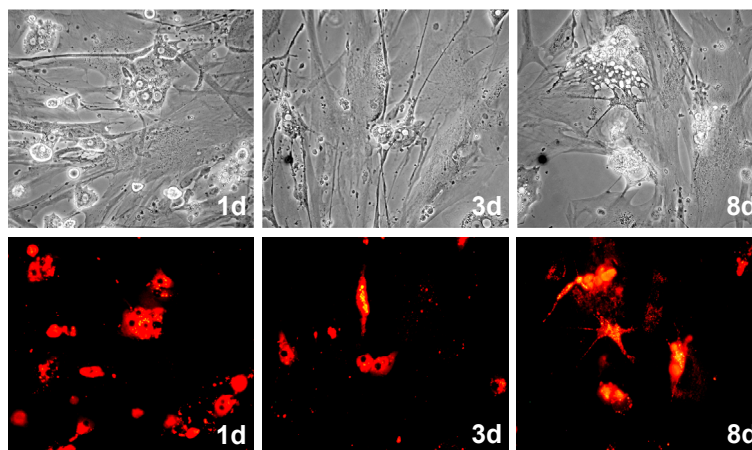


Abbildung 4: Co-Kultur DiI-markierter humaner Hepatozyten auf humanen Nichtparenchymzellen der Leber. Oben: Kulturen im Hellfeld, unten: dieselben Gesichtsfelder in der Fluoreszenzmikroskopie, Originalvergrößerung: 200x

3.2.2 Spezifische Funktionen in humanen Hepatozyten

Im Verlauf der Zellkultur blieb die Harnstoffsynthese (Abbildung 5, links), die EROD-Aktivität (Abbildung 5, Mitte) und auch die PROD-Aktivität (Abbildung 5, rechts) in primären humanen Hepatozyten nahezu konstant. Verglichen mit dem Tag 1 konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Verlauf der Zellkultur nachgewiesen werden.

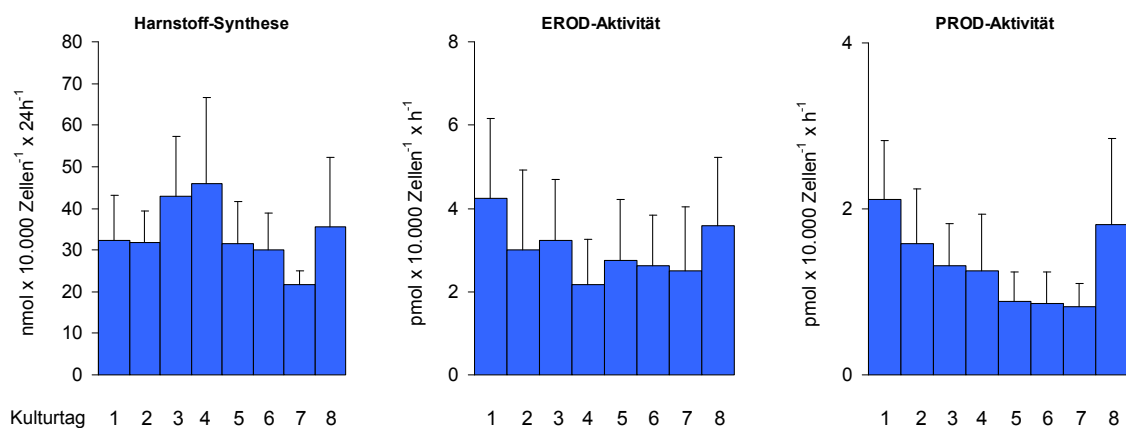


Abbildung 5: Harnstoffsynthese, EROD- und PROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären humanen Hepatozyten. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=4-5$ (Harnstoffsynthese) sowie $n=3$ (EROD- und PROD-Aktivität) unabhängigen Zellpräparationen.

Induktion ab dem Tag 0 der Zellkultur

Zur Induktion der Harnstoffsynthese und EROD-Aktivität wurden die serumfrei kultivierten humanen Hepatozyten mit CPT-cAMP bzw. β -Naphthoflavon behandelt.

Bei einem Zusatz über die gesamte Kulturdauer konnte die Harnstoffsynthese durch CPT-cAMP nicht stimuliert werden. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen induzierten Zellen und unbehandelten Kontrollen (Abbildung 6, links). Bei der EROD-Aktivität zeigten sich in der Mitte des Kulturzeitraumes höhere Werte unter dem Einfluss des β -Naphthoflavons (Abbildung 6, rechts).

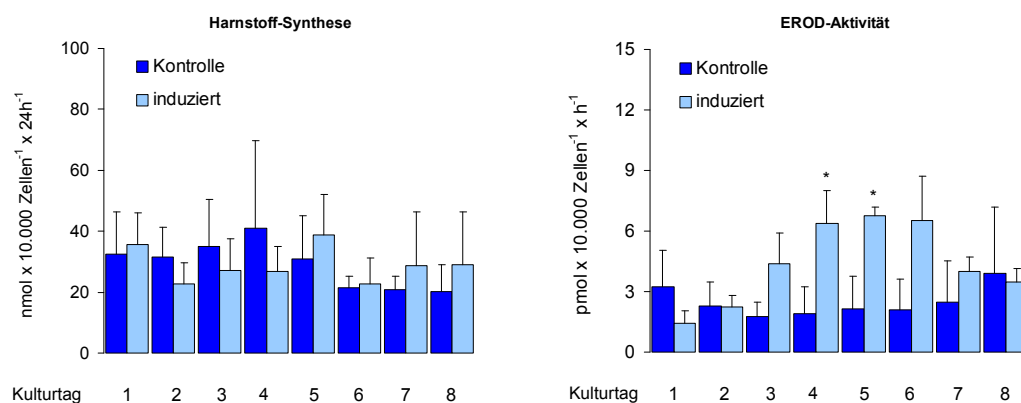


Abbildung 6: Induzierbarkeit von Harnstoffsynthese und EROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären humanen Hepatozyten durch permanenten Zusatz von 50 μ M CPT-cAMP bzw. 50 μ M β -Naphthoflavon zum Nährmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-5$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Kultur

Induktion ab dem Tag 4 der Zellkultur

In einer weiteren Versuchsserie wurden die Hepatozyten zunächst für vier Tage kultiviert, bevor mit der Stimulation begonnen wurde. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob die Signalwege auch ohne eine zusätzliche Stimulation unter serumfreien Kulturbedingungen über eine längere Zeit intakt bleiben und zu einem späteren Zeitpunkt reaktiviert werden können. Während der Zusatz von CPT-cAMP zum Nährmedium ab dem Tag 0 nicht zu einer Induktion der Harnstoffsyntheserate führte (vgl. Abbildung 6, links), konnte durch den Zusatz ab dem vierten Kulturtag in der Mitte und zum Ende des Kulturzeitraumes eine deutlich erhöhte Harnstoffsyntheserate beobachtet werden (Abbildung 7, links).

Der Zusatz von β -Naphthoflavon ab dem Tag 4 der Zellkultur resultiert zur Mitte und zum Ende des Beobachtungszeitraumes in einer signifikant höheren EROD-Aktivität (Abbildung 7, rechts).

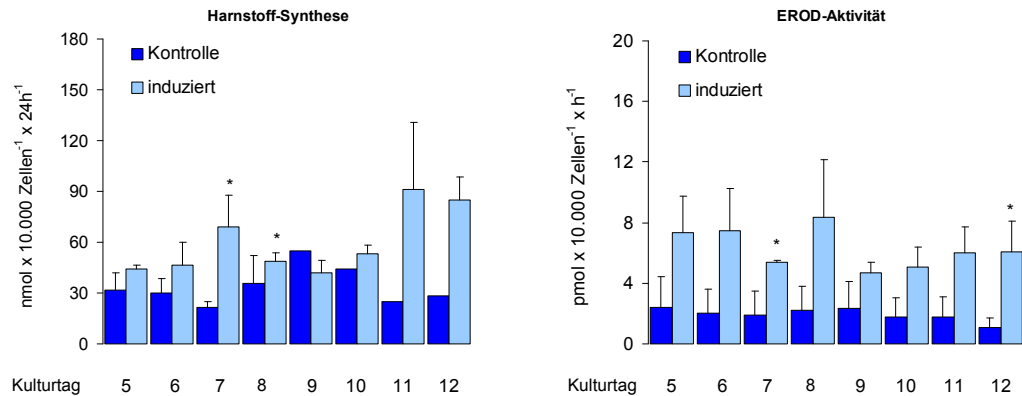


Abbildung 7: Induzierbarkeit von Harnstoffsynthese und EROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären humanen Hepatozyten durch Zusatz von $50 \mu\text{M}$ CPT-cAMP bzw. $50 \mu\text{M}$ β -Naphthoflavon zum Nährmedium ab dem Tag 4 der Zellkultur. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=2-4$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Kultur

Zusammenfassung

Humane Hepatozyten konnten trotz Verwendung von Wachstumsfaktoren *in vitro* nicht expandiert werden. Obwohl ein messbarer BrdU-Einbau stattfand, konnte keine Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Während der Primärkultur stieg der zelluläre DNA-Gehalt an, was auf Endomitosen und einen erhöhten Ploidiegrad der kultivierten Hepatozyten zum Ende der Kulturdauer schließen lässt. Ein gleichzeitig steigender zellulärer ATP-Gehalt deutet auf sehr vitale Zellen hin. Hepatozytenspezifische Funktionen, wie Harnstoffsynthese, EROD- und PROD-Aktivität blieben über die Kultur konstant und konnten nur bedingt induziert werden. Auch die Co-Kultur mit humanen Nichtparenchymzellen führte nicht zu einer *in vitro*-Proliferation humaner Hepatozyten.

3.3 Proliferation und Funktion von Schweinehepatozyten

3.3.1 Proliferation von Schweinehepatozyten

Mikroskopisch zeigten die porcinen Hepatozyten ihre typische polygonale Form bis zum Tag 4 der Zellkultur. Die Zellkerne waren zunächst noch vergleichsweise klein, wurden dann aber immer prominenter. Mit fortschreitender Kultur verringerte sich die Größe der Zellen zunehmend. Am 8. Kulturtag waren die Zellen in der Kulturschale so dicht gewachsen, dass kaum noch morphologische Details erkennbar waren. Im Verlauf der Kultur nahm das Kern/Zytoplasma-Verhältnis sichtbar zu (Abbildung 8, links). Nach fünf Tagen in Kultur hatte sich die Zellzahl verfünffacht. Bis zum achten Tag in Kultur nahm die Zellzahl nicht mehr nennenswert zu (Abbildung 8, rechts).

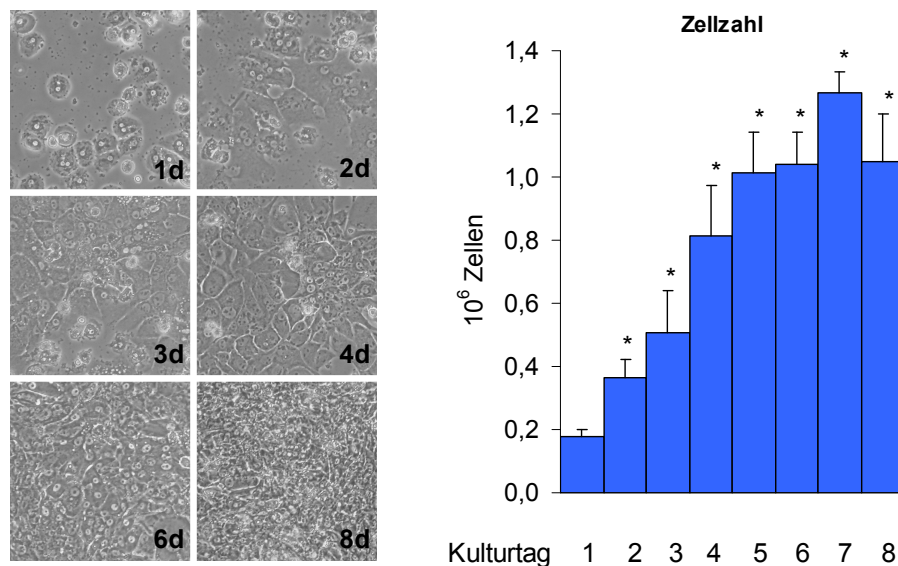


Abbildung 8: Zellzahlentwicklung während der 8-tägigen serumfreien Kultur primärer Schweinehepatozyten. Links: repräsentative Fotos der Zellkultur (Originalvergrößerung 100x), rechts: Zellzahl je Well der 6-Well-Platte. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-6$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Kultur

Im Verlauf der Kultur porciner Hepatozyten stieg der BrdU-Einbau transient an. Das Maximum wurde am dritten Kulturtag erreicht. Etwa ab dem fünften Kulturtag waren nur noch basale Werte messbar (Abbildung 9, links). Der zelluläre DNA-Gehalt blieb über die gesamte Kulturdauer nahezu konstant (Abbildung 9, Mitte). Der zelluläre ATP-Gehalt verdoppelte sich zunächst und verringerte sich dann wieder auf Ausgangswerte (Abbildung 9, rechts).

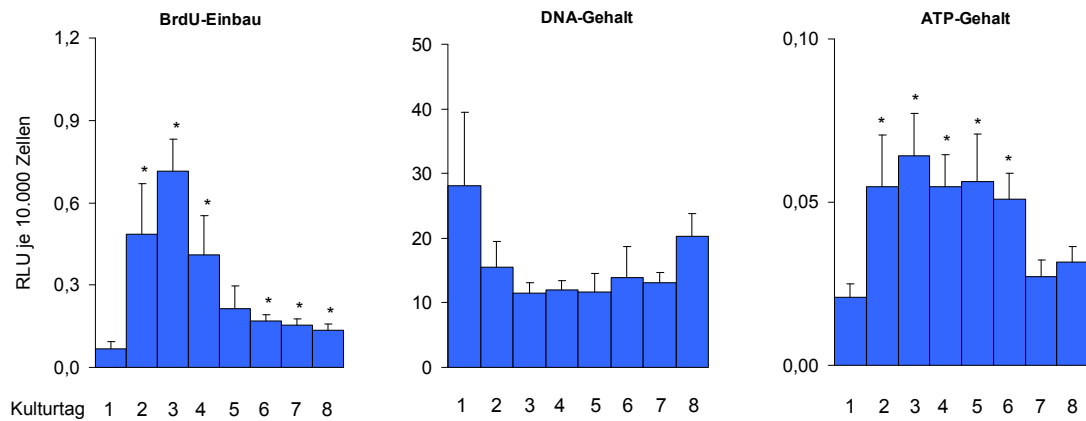


Abbildung 9: BrdU-Einbau, DNA- und ATP-Gehalt in serumfrei kultivierten, primären Schweinehepatozyten. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-6$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Kultur

3.3.2 Spezifische Funktionen in Schweinehepatozyten

Im Verlauf der Kultur porciner Hepatozyten nahmen die hepatozytenspezifischen Funktionen ab. Während die Harnstoffsyntheserate innerhalb von 5 Tagen auf basale Werte sank, konnten für die EROD- und PROD-Aktivität nur am Tag 1 der Kultur hohe Werte gemessen werden. Danach kam es zu einer drastischen Verminderung der Enzymaktivitäten auf basale Werte (Abbildung 10).

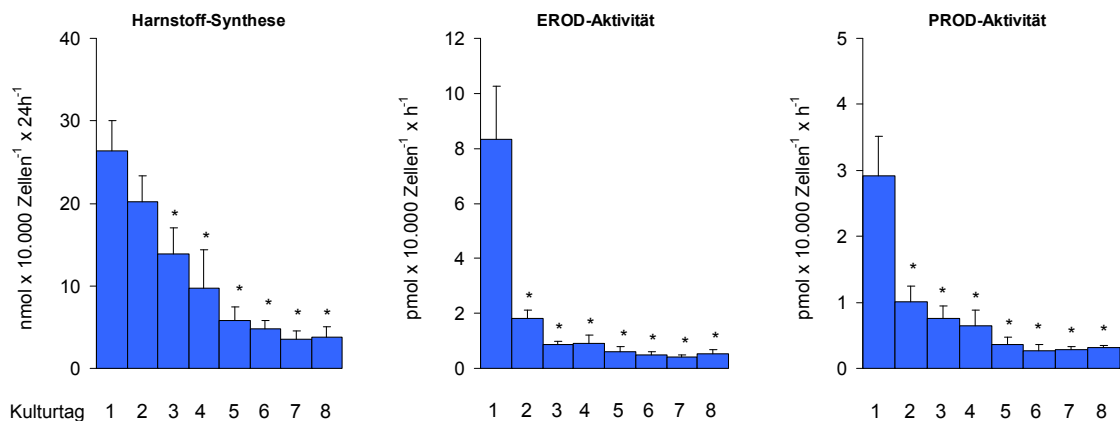


Abbildung 10: Harnstoffsynthese, EROD- und PROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären Schweinehepatozyten. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=5-6$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Kultur

Induktion ab dem Tag 0 der Zellkultur

Durch die 24-stündige Behandlung mit CPT-cAMP oder β -Naphthoflavon sollten Harnstoffsynthese bzw. EROD-Aktivität in serumfrei kultivierten Schweinehepatozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur (1, 3 und 6 Tage nach Kulturbeginn) induziert werden. Während durch den Zusatz von CPT-cAMP zum Nährmedium keine signifikant höhere Harnstoffsynthese induziert werden konnte (Abbildung 11, links), führte die Behandlung mit β -Naphthoflavon bei drei Tage kultivierten Hepatozyten zu einer ca. 3-fach höheren EROD-Aktivität gegenüber den unbehandelten Zellen (Abbildung 11, rechts).

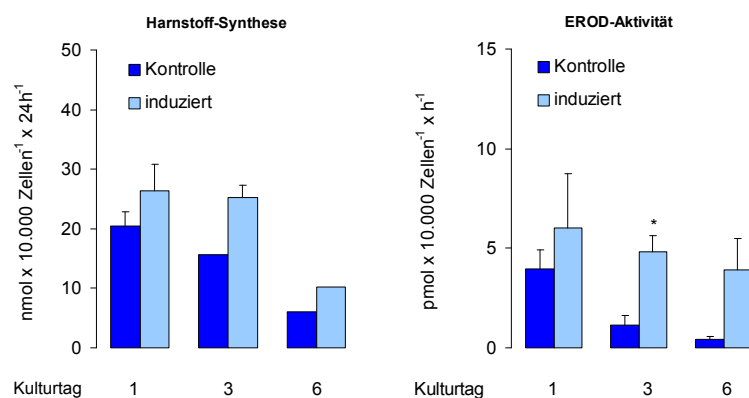


Abbildung 11: Induzierbarkeit von Harnstoffsynthese und EROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären Schweinehepatozyten. Der Zusatz von $50 \mu\text{M}$ CPT-cAMP bzw. $50 \mu\text{M}$ β -Naphthoflavon zum Nährmedium erfolgte jeweils 24 h vor der Bestimmung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=2-3$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Kultur

3.4 Subkultur von Schweinehepatozyten

Porcine Hepatozyten konnten während der Primärkultur 5-fach expandiert werden. Zur Untersuchung, ob sich die Zellen weiter vermehren ließen, wurden in einem separaten Versuchsansatz Subkulturen etabliert und funktionell charakterisiert. Nachdem die Hepatozyten am Tag 3 der Primärkultur ca. 90% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert. Die Zellen wurden kultiviert und erneut passagiert, sobald sie nach durchschnittlich drei Tagen wiederum ca. 90% Konfluenz erreicht hatten. Die Subkulturen wurden über jeweils sechs Tage untersucht.

3.4.1 Proliferation passagierter Schweinehepatozyten

Die primären Hepatozyten zeigten am Anfang der Zellkultur eine typische, polygonale Form. Nach 6-tägiger Kultur waren die Zellen deutlich kleiner. Es waren kaum noch morphologische Details erkennbar. In der Regel wurden die Zellen nach drei Tagen in Kultur gesplittet und subkultiviert. Aufgrund der im Vergleich zur Primärkultur geringeren Zelldichte wiesen die passagierten Zellen eine andere Morphologie auf. Sie erschienen etwas langgestreckter und unregelmäßiger in der Form. Bis zur zweiten Passage verhielten sich die Zellen morphologisch wie die Primärkultur. Nach sechs Tagen in Kultur hatten die Zellen polygonale Formen angenommen und wiesen ein hohes Kern/Zytoplasma-Verhältnis auf. Ab der dritten Passage waren nur noch geringe Änderungen ihrer Morphologie während der Kultur zu beobachten. Am 6. Tag der Kultur war das Kern/Zytoplasma-Verhältnis vergleichbar dem am Tag 1 der jeweiligen Subkultur (Abbildung 12).

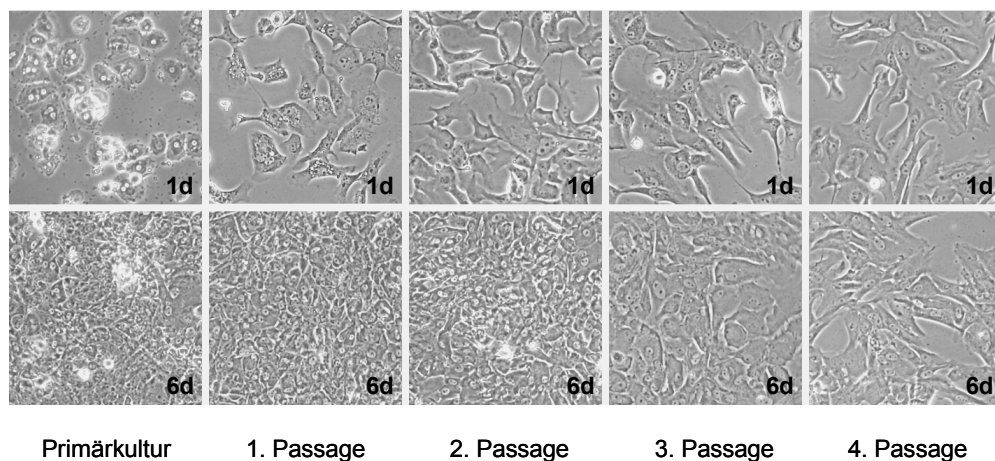


Abbildung 12: Morphologische Veränderungen während der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach unterschiedlichen Passagen (1.-4. Passage). Originalvergrößerung 100x

Die wiederholte Passagierung der Schweinehepatozyten führte insgesamt zu einer 12-fachen Steigerung der Zellzahl im Vergleich zur Ausgangszellzahl (Tag 1 der Primärkultur). Ein deutlicher Zuwachs in der Zellzahl war nur in der Primärkultur und den beiden ersten Passagen zu verzeichnen. In der dritten Passage nahm die Zellzahl nur noch marginal zu, in der vierten Passage blieb sie konstant (Abbildung 13). In Primärkulturen lag die Plattierungseffizienz deutlich unter 50%, d.h., weniger als die Hälfte der ausplattierten Zellen hefteten am Boden der Kulturschalen an. In den Subkulturen wurde beobachtet, dass unter gleichen Bedingungen nahezu alle ausplattierten Hepatozyten anhefteten, die Plattierungseffizienzen betragen hier $\geq 90\%$.

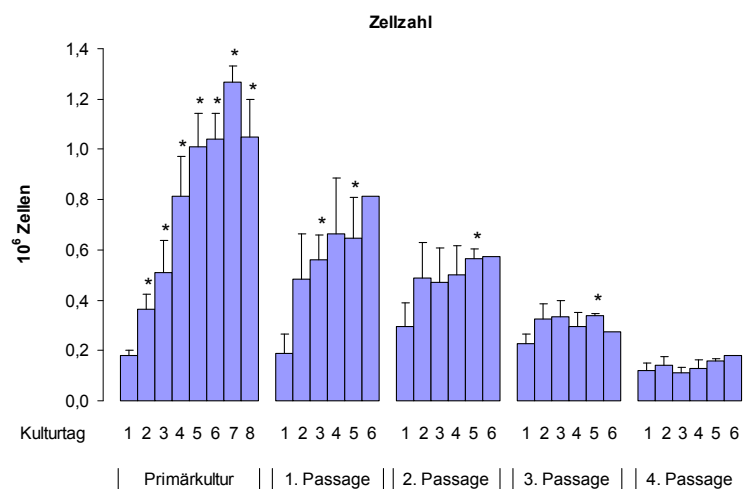


Abbildung 13: Veränderungen der Zellzahl im Verlauf der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-6$ (Primärkultur) bzw. $n=2-4$ (Subkultur) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Passage

Der BrdU-Einbau in den primär kultivierten Schweinehepatozyten war am Tag 3 der Kultur maximal und sank danach auf basale Werte. Für alle Subkulturen wurde jeweils am Tag 1 der Kulturen der höchste BrdU-Einbau gemessen, danach ging der BrdU-Einbau innerhalb von 1-2 Tagen auf basale Werte zurück. Der BrdU-Einbau am ersten Tag der Subkulturen war dabei deutlich höher, als das Maximum während der Primärzellkultur (Abbildung 14).

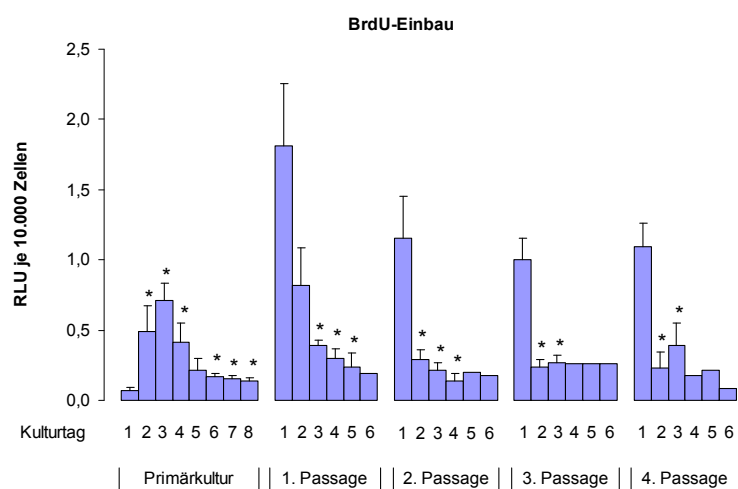


Abbildung 14: BrdU-Einbau im Verlauf der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-6$ (Primärkultur) bzw. $n=1-4$ (Subkultur) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Passage

Der zelluläre ATP-Gehalt stieg während der Primärkultur transient an. Innerhalb der ersten drei Passagen blieb der ATP-Gehalt über die Kulturdauer weitgehend konstant, lag jedoch deutlich über den Maximalwerten der Primärkultur. In der vierten Passage konnte dann eine Zunahme des ATP-Gehaltes im Verlauf der 6-tägigen Subkultur beobachtet werden. Der zelluläre ATP-Gehalt nahm von der Primärkultur bis zur vierten Passage signifikant zu (Abbildung 15).

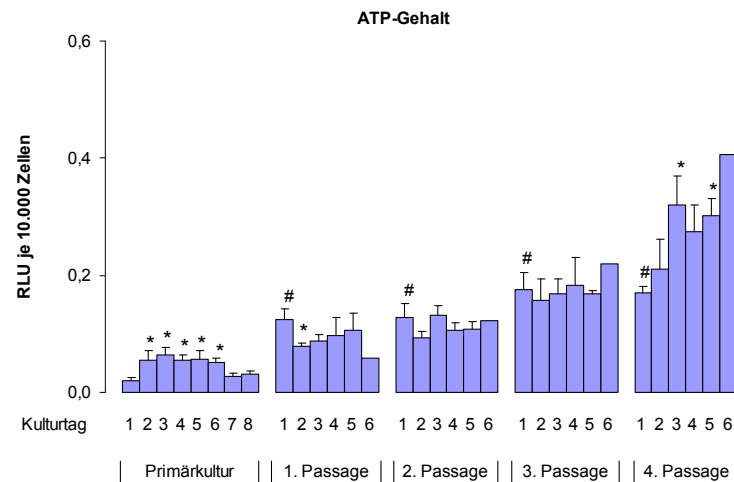


Abbildung 15: ATP-Gehalt im Verlauf der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-6$ (Primärkultur) bzw. $n=2-4$ (Subkultur) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Passage, # statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 8 der Primärkultur

Der DNA-Gehalt pro 10.000 Zellen blieb während der Primärkultur konstant. Für die 2.-4. Passage konnte eine Zunahme des DNA-Gehalts über die Kulturdauer beobachtet werden. Durchschnittlich war der zelluläre DNA-Gehalt in diesen Passagen nach sechs Tagen in Kultur etwa doppelt so hoch, wie zu Beginn der Kultur (Abbildung 16). Ein höherer zellulärer DNA-Gehalt kann bei Hepatozyten einerseits bedeuten, dass infolge einer unvollständigen Mitose eine mehrkernige Zelle entstand, oder aber, dass sich der Chromosomensatz verdoppelt hat, es aber nicht zu einer Kernteilung kam, was sich in einem höheren nukleären Ploidiegrad widerspiegeln würde. Zur Differenzierung von nukleärer und zellulärer Polyploidie im Verlauf der wiederholten Passagierung wurde bei fünf unabhängigen Zellpräparationen jeweils für den ersten Kulturtag der Primärkultur der Anteil zweikerniger Zellen ermittelt. Dazu wurden mikroskopische Aufnahmen von fünf zufällig gewählten Gesichtsfeldern angefertigt. Innerhalb dieser Gesichtsfelder wurden auf einer Fläche von

2 x 2 mm alle Hepatozyten gezählt, deren Kernanzahl eindeutig erkennbar war. Der Anteil zweikerniger Zellen an der Gesamtzellzahl betrug $17,6 \pm 0,9\%$. In den Passagen 1-3 konnte die Anzahl mehrkerniger Zellen nicht mehr quantifiziert werden, da es nicht möglich war, zuverlässig zwischen den einzelnen Zellen bzw. zwischen Zellkern und Zytoplasma zu unterscheiden. In den Kulturen der vierten Passage wurden nur ganz vereinzelt zweikernige Zellen beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass die in der Primärkultur noch zahlreich vorhandenen zweikernigen Hepatozyten durch die wiederholte Passagierung „ausverdünnt“ wurden. Die Zunahme des zellulären DNA-Gehalts gibt daher einen ersten Hinweis auf einen erhöhten nukleären Ploidiegrad der mehrfach passagierten Hepatozyten.

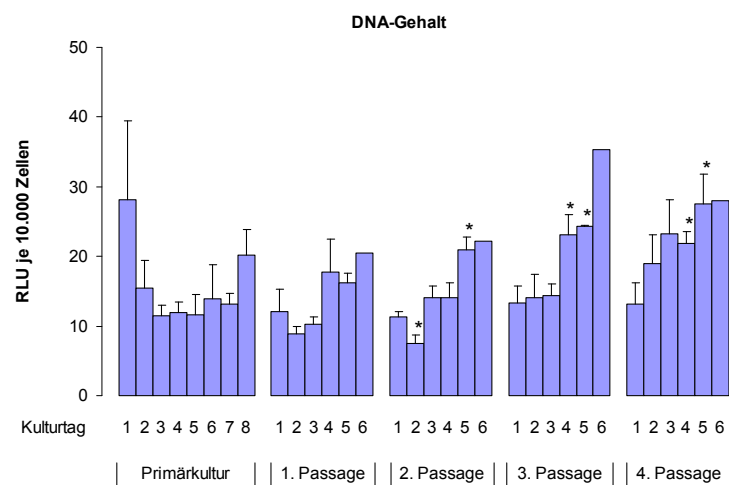


Abbildung 16: DNA-Gehalt im Verlauf der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-6$ (Primärkultur) bzw. $n=2-4$ (Subkultur) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Passage

3.4.2 Spezifische Funktionen in passagierten Schweinehepatozyten

Die Harnstoffsyntheserate in primär kultivierten Schweinehepatozyten sank im Verlauf der 8-tägigen Kultur kontinuierlich ab und betrug ab dem Tag 6 der Kultur nur noch ca. 20% der initialen Werte am Tag 1. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch für die erste Subkultur beobachtet. Innerhalb der folgenden Passagen war die Harnstoffsyntheserate bereits am Tag 1 der Kultur auf niedrigem Niveau und blieb im weiteren Verlauf nahezu unverändert. In der vierten Zellpassage war die Harnstoffsyntheserate leicht erhöht und vergleichbar der Harnstoffsyntheserate primär kultivierter Hepatozyten zum Ende des Kulturzeitraumes (Abbildung 17).

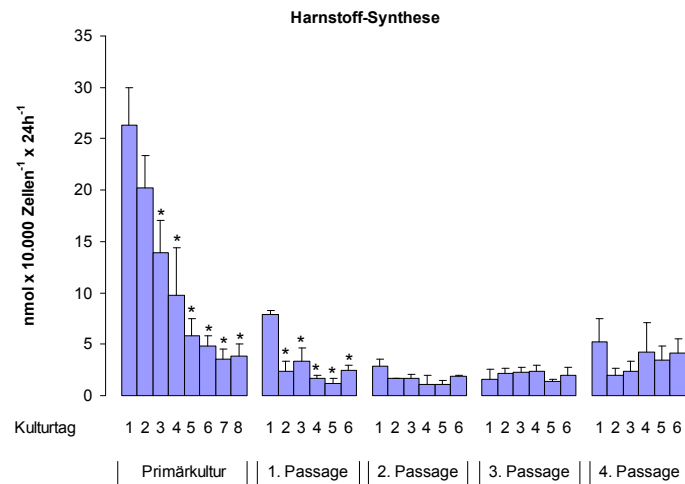


Abbildung 17: Harnstoffsyntheserate im Verlauf der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=5-6$ (Primärkultur) bzw. $n=3-4$ (Subkultur) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Passage

Die EROD-Aktivität in den primären Schweinehepatozyten sank bereits nach drei Tagen in Kultur auf basale Werte ab. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch in der 1. Passage beobachtet, wenn auch die Ausgangswerte deutlich niedriger waren. Die Enzymaktivitäten in Hepatozyten der zweiten und dritten Passage blieben nahezu konstant, die EROD-Aktivität in Hepatozyten der vierten Passage nahm während der Kultur leicht zu. Sie entsprach etwa der Aktivität, wie sie in zwei Tage kultivierten Primärzellen beobachtet wurde (Abbildung 18).

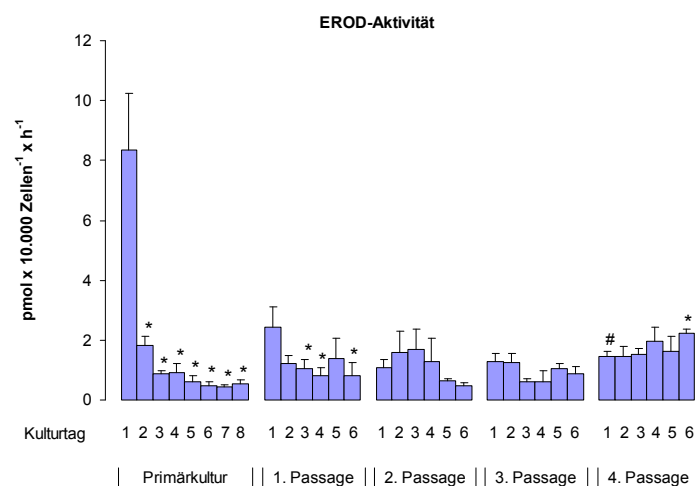


Abbildung 18: EROD-Aktivität im Verlauf der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=5-6$ (Primärkultur) bzw. $n=3-4$ (Subkultur) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Passage, # statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 8 der Primärkultur

Die PROD-Aktivität in der Primärkultur sank innerhalb von 5 Tagen auf basale Werte ab. Auch in den Zellen der 1. Passage wurde ein ähnlicher Verlauf beobachtet. Während der zweiten und dritten Passage blieb die Enzymaktivität über die Kulturdauer annähernd konstant auf dem Niveau der Aktivität drei Tage kultivierter Primärzellen. Die Zellen der vierten Passage zeigten einen Anstieg der PROD-Aktivität mit zunehmender Kulturdauer. Die mehrfache Passagierung der Zellen führte zu einer tendenziell höheren PROD-Aktivität mit zunehmender Anzahl der Passagen. Die PROD-Aktivität der Zellen der vierten Passage unterschied sich statistisch nicht signifikant von der Enzymaktivität primär kultivierter Schweinehepatozyten am Tag 1, welche die höchste PROD-Aktivität der gesamten Versuchsserie aufwiesen (Abbildung 19).

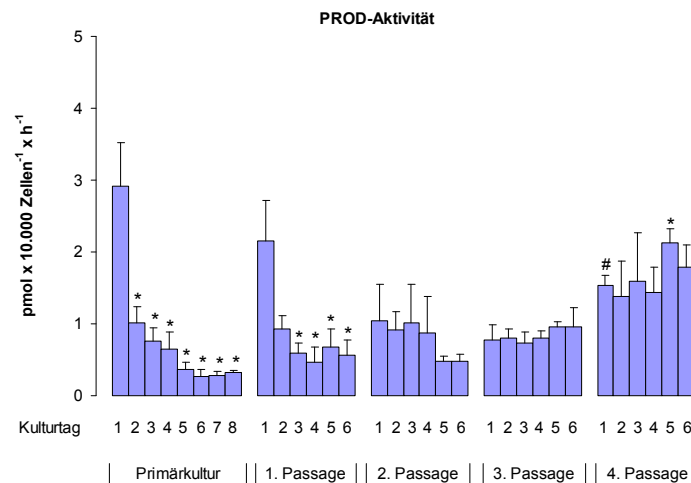


Abbildung 19: PROD-Aktivität im Verlauf der serumfreien Kultur porciner Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=5-6$ (Primärkultur) bzw. $n=3-4$ (Subkultur) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Passage, # statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 8 der Primärkultur

Induktionsversuche

Durch den Zusatz von CPT-cAMP oder β -Naphthoflavon für entweder nur 24 h oder für die gesamte Kulturdauer sollten Harnstoffsyntheserate und EROD-Aktivität in passagierten Schweinehepatozyten stimuliert werden.

Die 24 h-Behandlung mit $50 \mu\text{M}$ CPT-cAMP verminderte den Abfall der Harnstoffsyntheserate in primär kultivierten Hepatozyten und stimulierte die Harnstoffsyntheserate in allen Subkulturen ca. 2-fach gegenüber nicht-stimulierten Zellen (Abbildung 20, oben). Wurde CPT-cAMP während der gesamten Kulturdauer zugesetzt,

ergaben sich qualitativ ähnliche Ergebnisse wie für die 24-stündige Induktion. Allerdings war die Wirkung des Induktors deutlich stärker. Am Tag 3 und 6 der einzelnen Subkulturen wurde eine ca. 3-fach bzw. 7-fach höhere Harnstoffsyntheserate unter Einfluss des Induktors gemessen (Abbildung 20, unten).

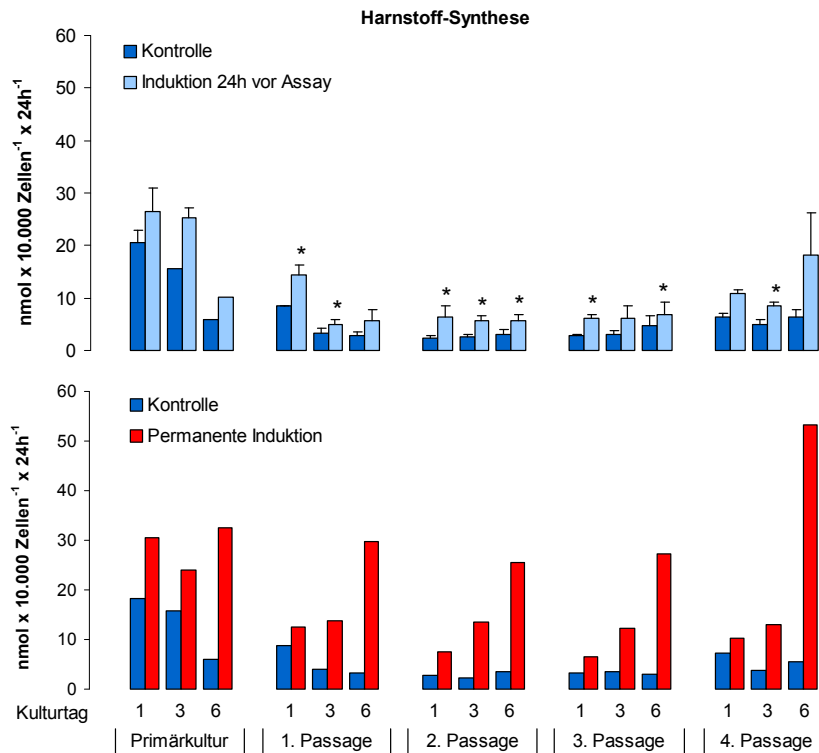


Abbildung 20: Zeitabhängige Induktion der Harnstoffsyntheserate in serumfrei kultivierten porcinen Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. 50 μ M CPT-cAMP wurde jeweils 24 h vor dem Assay (oben) bzw. während der gesamten Kulturdauer (unten) zugesetzt. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=2-3$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

Die Zugabe von β -Naphthoflavin für 24 h bzw. während der gesamten Kulturdauer stimulierte die EROD-Aktivität in primär kultivierten und passagierten Schweinehepatozyten in vergleichbarem Ausmaß. Das β -Naphthoflavin führte in Primärkulturen und in allen Subkulturen zu einer erhöhten EROD-Aktivität. Das Ausmaß der Induktion nahm von Passage zu Passage zu. Während in Zellen der 1. Passage die stimulierte EROD-Aktivität bis zu 5-fach über der nicht-stimulierten Aktivität lag, waren in Zellen der 4. Passage bis zu 12-fach gesteigerte Enzymaktivitäten gegenüber nicht-stimulierten Enzymaktivitäten zu beobachten (Abbildung 21).

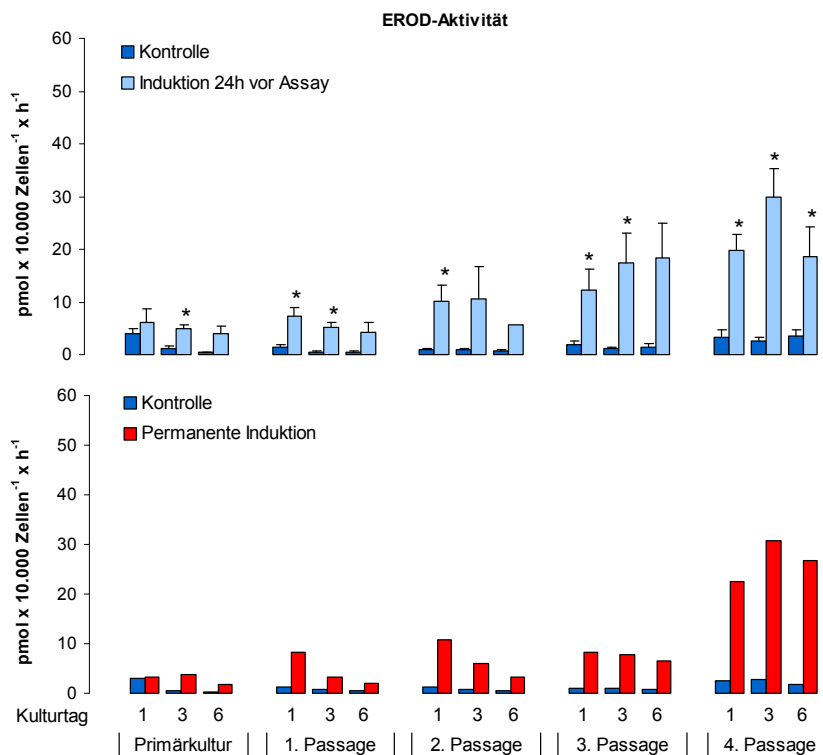


Abbildung 21: Zeitabhängige Induktion der EROD-Aktivität in serumfrei kultivierten porcinen Hepatozyten nach wiederholter Subkultivierung. Der Induktor β -Naphthoflavon wurde jeweils 24 h (oben) vor der Aktivitätsbestimmung bzw. während der gesamten Kulturdauer (unten) zugesetzt. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=2-3$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

Zusammenfassung

In der Primärkultur konnten porcine Hepatozyten 5-fach vermehrt werden. Diese Expansion war mit einem deutlichen Verlust hepatozytenspezifischer Stoffwechsellleistungen (Harnstoffsynthese, EROD-, PROD-Aktivität) verbunden, welcher jedoch durch geeignete Stimuli verzögert bzw. ganz verhindert werden konnte. Durch serielle Subkultivierung gelang es, die Ausgangszellzahl 12-fach zu expandieren. Von Passage zu Passage sowie innerhalb einzelner Passagen stiegen zellulärer ATP- und DNA-Gehalt an. Für die EROD- und PROD-Aktivität wurde ein partieller Zuwachs in späten Zellpassagen beobachtet. Die Induzierbarkeit zellspezifischer Stoffwechsellleistungen blieb in allen Subkulturen erhalten.

3.5 Proliferation und Funktion von Rattenhepatozyten

3.5.1 Proliferation von Rattenhepatozyten

Während der serumfreien Kultur primärer Rattenhepatozyten behielten die Zellen ihre polygonale Form über den 8-tägigen Kulturverlauf, Zellgröße und auch das Kern/Zytoplasma-Verhältnis blieben nahezu konstant (Abbildung 22, links). Die Zellzahl war nach acht Tagen in Kultur 3-fach gegenüber der Ausgangszellzahl am Tag 1 erhöht (Abbildung 22, rechts).

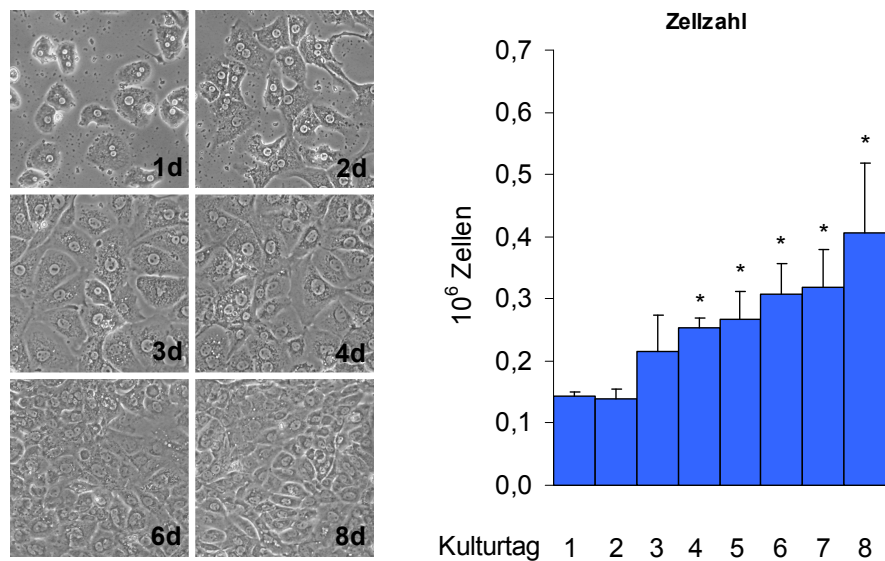


Abbildung 22: Zellzahlentwicklung während der 8-tägigen serumfreien Kultur primärer Rattenhepatozyten. Links: repräsentative Fotos der Zellkultur (Originalvergrößerung 100x), rechts: Zellzahl je Well der 6-Well-Platte. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-4$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Kultur

Im Verlauf der Zellkultur stieg der BrdU-Einbau transient an. Das Maximum wurde am dritten Kulturtag erreicht und fiel nach acht Tagen auf Werte ab, die jedoch noch ca. 4-fach höher im Vergleich zu den Werten am Tag 1 der Kultur waren (Abbildung 23, links). Der zelluläre DNA-Gehalt blieb während der Zellkultur konstant (Abbildung 23, Mitte). Parallel zum Maximum im BrdU-Einbau stieg der zelluläre ATP-Gehalt transient an und fiel danach kontinuierlich bis zum Tag 8 der Kultur wieder ab (Abbildung 23, rechts).

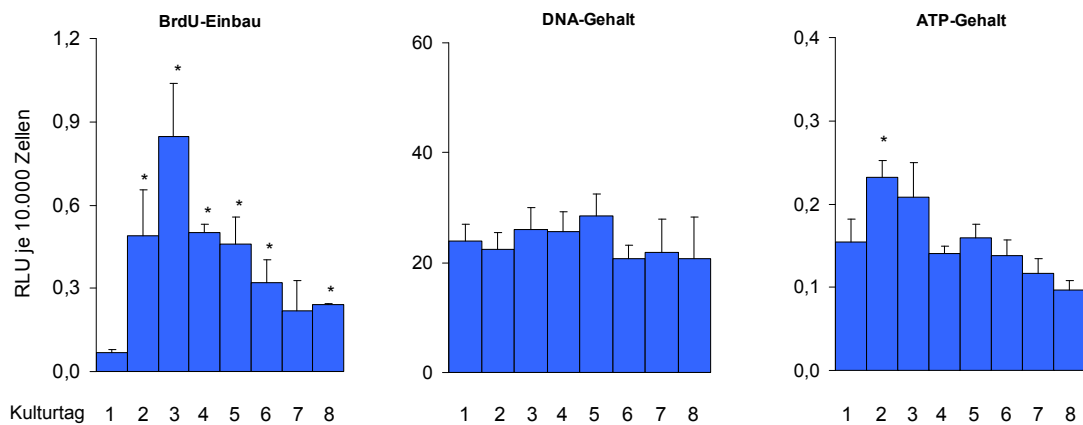


Abbildung 23: BrdU-Einbau, DNA- und ATP-Gehalt in serumfrei kultivierten, primären Rattenhepatozyten. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus n=3-4 unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Kultur

Die Proliferation der Rattenhepatozyten unter serumfreien Bedingungen erlaubte etwa eine Verdreifachung der Zellzahl innerhalb einer 8-tägigen Kulturdauer. In der Literatur finden sich Hinweise, dass die Proliferation von Rattenhepatozyten in Kultur u.a. durch $\text{TNF}\alpha$, ATP oder Serumzusatz verbessert werden kann. Daher wurde geprüft, ob durch diese Zusätze in Kombination mit den im Medium befindlichen Wachstumsfaktoren EGF und HGF eine verbesserte Proliferation erreicht werden konnte.

$\text{TNF}\alpha$

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass $\text{TNF}\alpha$ eine wesentliche Rolle bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie spielt (Akerman *et al.* 1992). Auch *in vitro* wirkt $\text{TNF}\alpha$ als Mitogen (Beyer *et al.* 1993, Haruyama *et al.* 2000, Iocca *et al.* 2003), indem es die Hepatozyten konditioniert, auf die Wachstumsfaktoren EGF und HGF zu reagieren (Fausto 2000, Webber *et al.* 1998). In diesem Versuchsansatz sollte geprüft werden, ob die Proliferation der Rattenhepatozyten mit EGF/HGF durch gleichzeitige Gabe von $\text{TNF}\alpha$ verbessert werden kann. $\text{TNF}\alpha$ konnte die durch EGF/HGF stimulierte Proliferation primärer Rattenhepatozyten in Kultur jedoch nicht weiter stimulieren. Es gab zum Ende der Zellkultur keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen mit EGF/HGF bzw. EGF/HGF/ $\text{TNF}\alpha$. Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch bei der Kultur mit und ohne Wachstumsfaktoren (Abbildung 24).

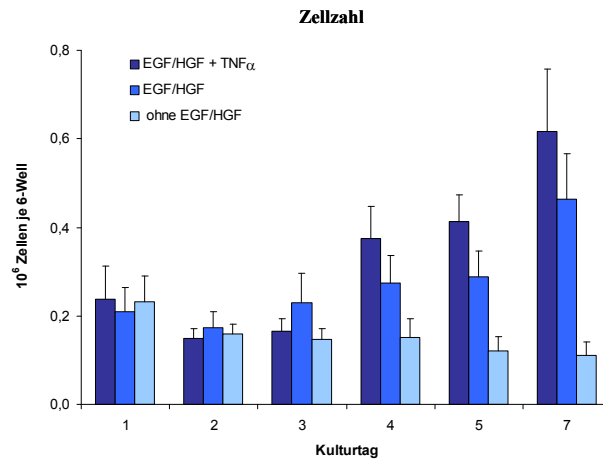


Abbildung 24: Stimulation der Proliferation von Rattenhepatozyten in serumfreier Kultur durch HGF/EGF bzw. in Kombination mit 100 ng/ml TNF α . Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus n=4 unabhängigen Zellpräparationen.

ATP

Thevananther *et al.* 2004 berichteten, dass die mitogene Wirkung von EGF durch Kombination mit extrazellulärem ATP γ S, einem schwer hydrolysierbaren ATP-Analogen, in serumfreier Kultur von Rattenhepatozyten potenziert wurde. Es sollte untersucht werden, ob die durch EGF/HGF stimulierte Proliferation primärer Rattenhepatozyten in Kombination mit ATP weiter gesteigert werden konnte. In dieser experimentellen Serie war die Stimulation der Proliferation der Zellen durch EGF/HGF insgesamt etwas geringer als bei anderen Versuchsansätzen. Die Kombination von ATP und EGF/HGF führte allerdings nicht zu einer signifikant besseren Proliferation der Zellen (Abbildung 25).

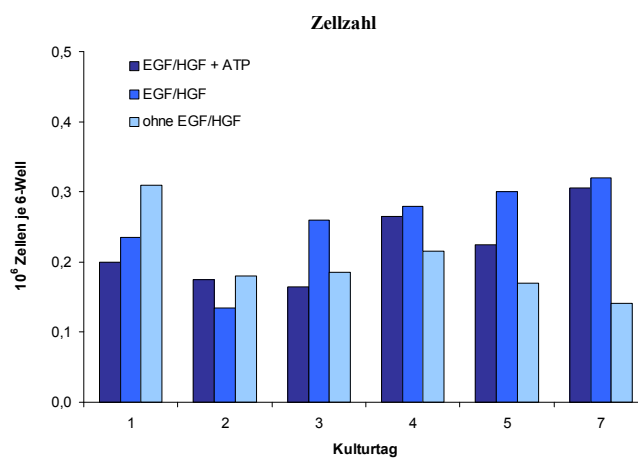


Abbildung 25: Stimulation der Proliferation von Rattenhepatozyten in serumfreier Kultur durch HGF/EGF bzw. in Kombination mit 100 μ M ATP. Dargestellt wurde der Mittelwert aus n=2 unabhängigen Zellpräparationen.

Serumzusatz

Vielfach werden in der Zellkultur Seren eingesetzt. Diese enthalten eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wenn auch in nicht genau definierter Konzentration. In den hier beschriebenen Versuchen wurde einerseits fötales Kälberserum (FKS) eingesetzt. Weiterhin wurde Serum, das von Ratten nach einer 2/3 Hepatektomie (PHx-Serum) gewonnen wurde, untersucht.¹² Während der Kultur der Rattenhepatozyten mit 10% fötalem Kälberserum bzw. 10% PHx-Serum konnte keine Proliferation der Zellen beobachtet werden. Die Zellzahl blieb gleich der in gänzlich ohne Wachstumsfaktoren mitgeführten Kulturen. Als weitere Kontrolle wurden Hepatozyten mit EGF/HGF kultiviert. Hier kam es etwa zu einer Verdopplung der Zellzahl am Tag 7 gegenüber dem Tag 1 der Kultur (Abbildung 26).

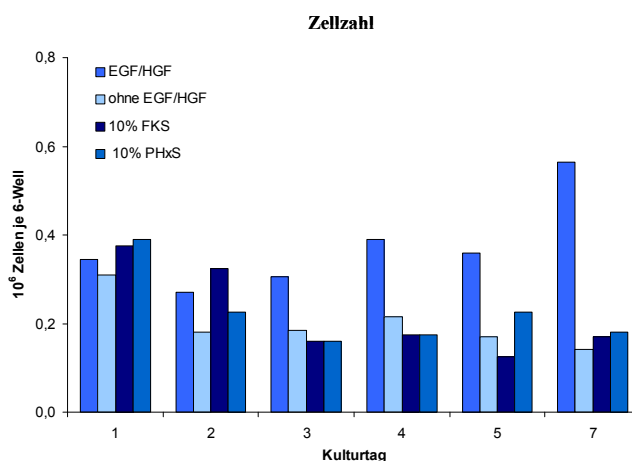


Abbildung 26: Zellzahl während der Kultur von Rattenhepatozyten mit EGF/HGF sowie 10% FKS bzw. 10% PHx-Serum. Dargestellt wurde der Mittelwert aus n=2 unabhängigen Zellpräparationen.

3.5.2 Spezifische Funktionen in Rattenhepatozyten

Während der Kultur primärer Rattenhepatozyten blieb die Harnstoffsyntheserate in den ersten drei Kulturtagen konstant und sank dann bis zum Tag 8 kontinuierlich bis auf ca. 20% der Werte am Tag 1 der Kultur ab (Abbildung 27, links). Zur Mitte des Kulturzeitraumes wurde ein transients Anstieg der EROD-Aktivität beobachtet. Bis zum Tag 8 der Kultur verringerte sich die EROD-Aktivität auf ca. 50% der Ausgangswerte (Abbildung 27, Mitte).

¹² Das PHx-Serum wurde 48 h nach Leberresektion gewonnen und sollte zu diesem Zeitpunkt diejenigen löslichen Faktoren enthalten, die zur Leberregeneration *in vivo* benötigt werden (Michalopoulos, 1982; Moolten, 1967).

Die PROD-Aktivität in den Rattenhepatozyten blieb zunächst für drei Tage unverändert, sank dann bis zum 5. Tag auf ca. 25% der Ausgangswerte und blieb danach konstant (Abbildung 27, rechts).

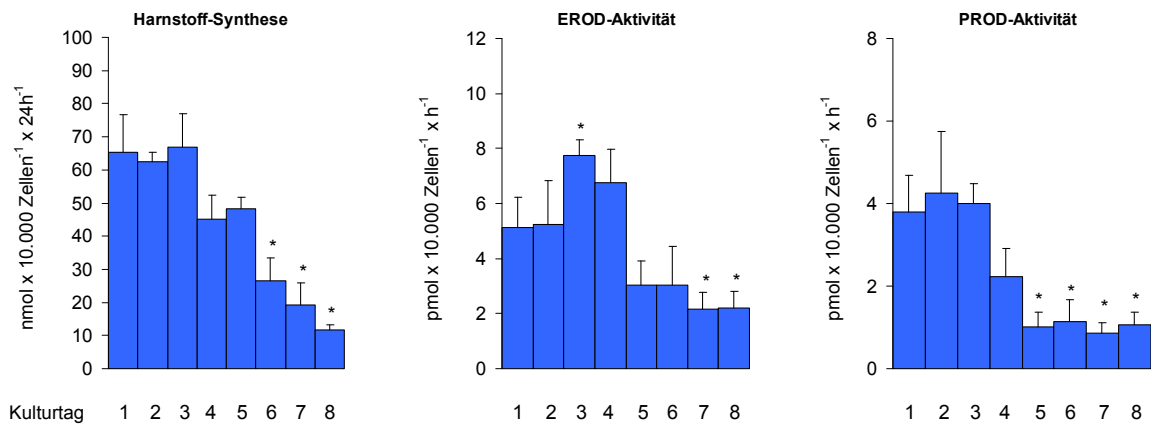


Abbildung 27: Harnstoffsynthese, EROD- und PROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären Rattenhepatozyten. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3-5$ (Harnstoffsynthese) sowie $n=3-7$ (EROD- und PROD-Aktivität) unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Tag 1 der jeweiligen Kultur

Induktionsversuche ab dem Tag 0 der Zellkultur

Die Induzierbarkeit der Harnstoffsyntheserate und der EROD-Aktivität wurde in serumfrei kultivierten Rattenhepatozyten durch Zugabe von $50 \mu\text{M}$ CPT-cAMP bzw. $50 \mu\text{M}$ β -Naphthoflavon während der gesamten Kulturdauer untersucht. 48 h nach Zugabe des CPT-cAMP wurde eine 2-fach erhöhte Harnstoffsyntheserate gegenüber unbehandelten Rattenhepatozyten beobachtet. Aufgrund der kontinuierlichen Abnahme der Harnstoffsyntheserate bis zum 8. Kulturtag in nicht-stimulierten Zellen wurden in stimulierten Zellkulturen bis zu 10-fach höhere Harnstoffsyntheseraten gemessen. Diese lagen ca. 2-fach über den Ausgangswerten in nicht-stimulierten Zellen am Tag 1 der Kultur (Abbildung 28, links).

Beginnend 72 h nach Zugabe des β -Naphthoflavons wurde eine signifikant höhere EROD-Aktivität gemessen. Die induzierten EROD-Aktivitäten waren ab der Mitte des Kulturzeitraumes etwa 6-fach höher als in den nicht-stimulierten Kontrollen sowie in den frisch kultivierten Zellen am Tag 1 der Zellkultur (Abbildung 28, rechts).

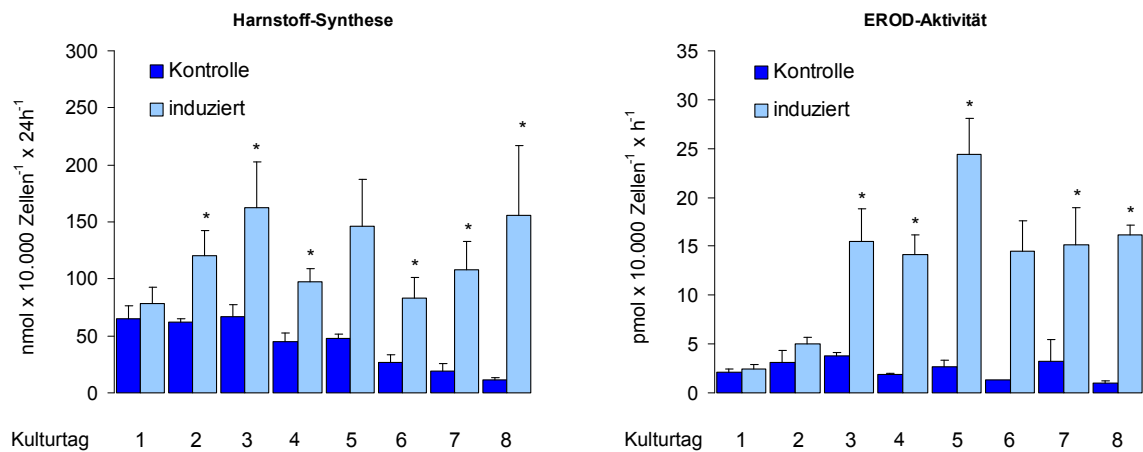


Abbildung 28: Induzierbarkeit von Harnstoffsyntheserate und EROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären Rattenhepatozyten durch Zusatz von 50 μM CPT-cAMP bzw. 50 μM β -Naphthoflavin zum Nährmedium während des gesamten Kulturverlaufs. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=2-4$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

Induktionsversuche ab dem Tag 4 der Zellkultur

Die Stimulation der Rattenhepatozyten mit CPT-cAMP ab dem Tag 4 der Zellkultur führte zu einer Induktion der Harnstoffsyntheserate. Aufgrund der beständig sinkenden Harnstoffsyntheserate in den nicht-stimulierten Hepatozyten ergab sich durch den CPT-cAMP-Zusatz eine 2-8-fache Steigerung der Harnstoffsyntheserate (Abbildung 29, links). Die induzierten Harnstoffsyntheseraten waren an jedem Tag deutlich höher als die Harnstoffsynthese in nicht-stimulierten Zellen am Tag 5 der Zellkultur.

Der Zusatz von β -Naphthoflavin ab dem vierten Tag der Zellkultur führte zur Induktion der EROD-Aktivität. Die EROD-Aktivität sank während der Kulturdauer sowohl in nicht-induzierten Zellen als auch in den stimulierten Zellen (Abbildung 29, rechts). Sie war gegenüber den nicht-stimulierten Kontrollen 2-8-fach gesteigert.

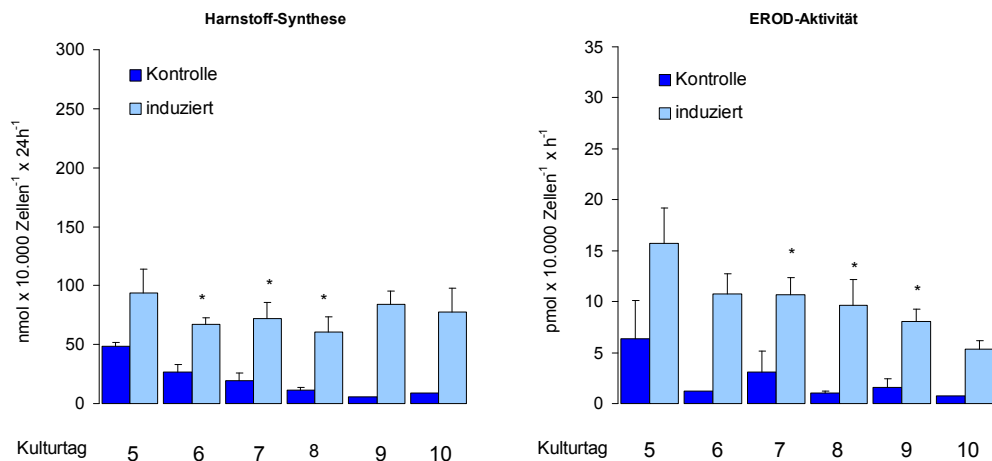


Abbildung 29: Induzierbarkeit von Harnstoffsyntheserate und EROD-Aktivität in serumfrei kultivierten, primären Rattenhepatozyten durch Zusatz von $50 \mu\text{M}$ CPT-cAMP bzw. $50 \mu\text{M}$ β -Naphthoflavin zum Nährmedium ab dem vierten Tag der Zellkultur. Dargestellt wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=2-4$ unabhängigen Zellpräparationen.

* statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

3.6 Hepatozytäre Marker serumfrei kultivierter Rattenhepatozyten

Die bisher vorgestellten Daten hepatozytenspezifischer Stoffwechselleistungen (EROD- und PROD-Aktivität, Harnstoffsyntheserate) zeigen deutlich, dass proliferierende Rattenhepatozyten während längerer Kulturdauer zellspezifische Funktionen zumindest teilweise verlieren. In Hinblick auf eine Anwendung der Hepatozytentransplantation beim Menschen ist es in Anbetracht nur in unzureichender Anzahl zur Verfügung stehender Spenderlebern dennoch wünschenswert, die Hepatozyten vor einer Zelltransplantation zu kultivieren und zu vermehren.

In den Induktionsversuchen konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust kulturbedingt ist und unter Verwendung geeigneter Stimuli gebremst oder auch in einen Zuwachs an Funktionalität gewandelt werden kann. Daher kann angenommen werden, dass der Funktionsverlust *in vitro*-expandierter Hepatozyten nach Transplantation in eine Empfängerleber, welche ein für Funktionserhalt und Proliferation geeignetes Mikromilieu bereitstellt, ebenfalls rekonstituiert würde. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden in den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen die Hepatozyten zunächst kultiviert und hinsichtlich der Expression einiger hepatozytenspezifischer Marker während der serumfreien Kultur charakterisiert. Einerseits waren das Enzyme, deren Aktivität bereits in den funktionellen Untersuchungen an den kultivierten Zellen untersucht wurde (CYP1A1=EROD-

Aktivität, CYP2B1=PROD-Aktivität, CPS I=Schlüsselenzym der Harnstoffsynthese). Andererseits wurden auch zelluläre Marker untersucht (PCK1, CK18, CX32).

In den Western Blot-Analysen war die zytosolische Form der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK1) nur in den frisch isolierten Zellen nachweisbar, die mRNA-Expression der PCK1 nahm im Verlauf der Kultur deutlich zu. In Übereinstimmung mit den Western Blots konnte die PCK1 immunocytochemisch nur zu frühen Zeiten der Kultur (Tag 0) nachgewiesen werden, nicht jedoch am Tag 7. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für die Expression des hepatozytenspezifischen Gap Junction-Proteins Connexin 32 (CX32). Der epitheliale Marker Cytokeratin 18 (CK18) konnte immunocytochemisch sowohl am Anfang als auch am Ende der Kultur nachgewiesen werden. Die Western Blot-Analysen zeigten eine zunehmende Proteinexpression bei gleichbleibender mRNA-Menge (Abbildung 30).

Ähnlich wie bei PCK1 und CX32 wurde auch für das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) zum Ende der Kultur eine zunehmende Expression auf mRNA-Ebene beobachtet, das Protein konnte sowohl in den Western Blot Analysen als auch in der Immunocytochemie nur zu frühen Zeitpunkten der serumfreien Zellkultur detektiert werden. Für die Carbamylphosphat-synthetase I (CPS I) wurde eine deutlich verminderte Proteinexpression zum Ende der Kulturdauer beobachtet, allerdings konnte das Protein sowohl im Western Blot als auch in der Immunocytochemie auch am 8. Kulturtag noch nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression für CPS I blieb dagegen über die gesamte Kulturdauer unverändert (Abbildung 31).

Nachdem die serumfrei kultivierten Rattenhepatozyten hinsichtlich einiger hepatozytärer Merkmale charakterisiert worden waren, wurden diese Zellen für Transplantations- und Repopulationsversuche eingesetzt.

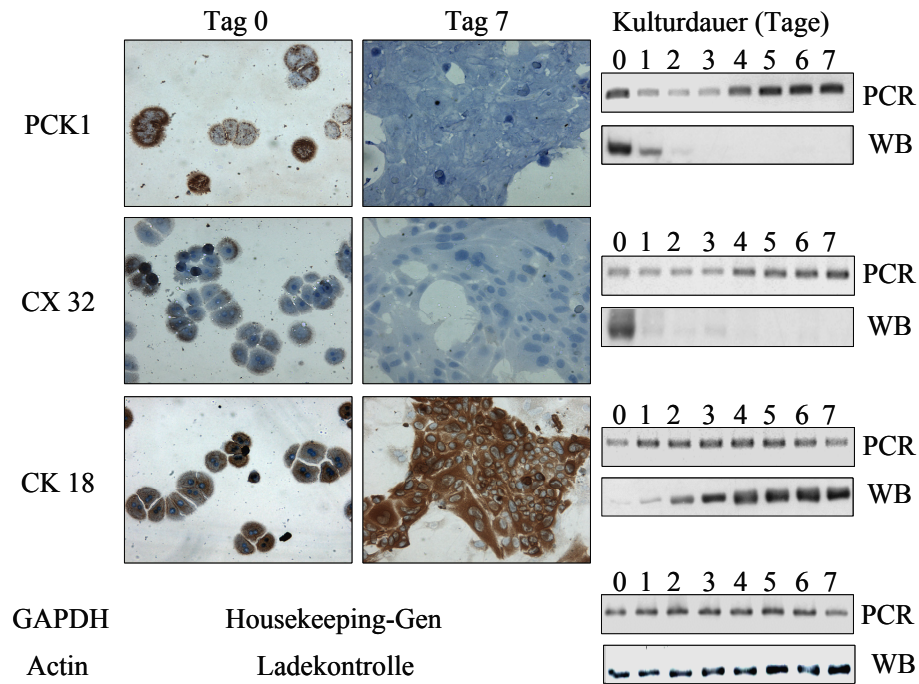


Abbildung 30: Nachweis von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK1), Connexin 32 (CX32) und Cytokeratin 18 (CK18) während der serumfreien Kultur von Rattenhepatozyten durch PCR-Analysen (PCR), Western Blot-Analysen (WB) und immuncytochemische Färbungen. In der Immuncytochemie sind die detektierten Antigene an einer Braunfärbung erkennbar. Die Zellen wurden mit Hematoxylin gegengefärbt. Dadurch erscheinen die Zellkerne blau. GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Originalvergrößerung 100x

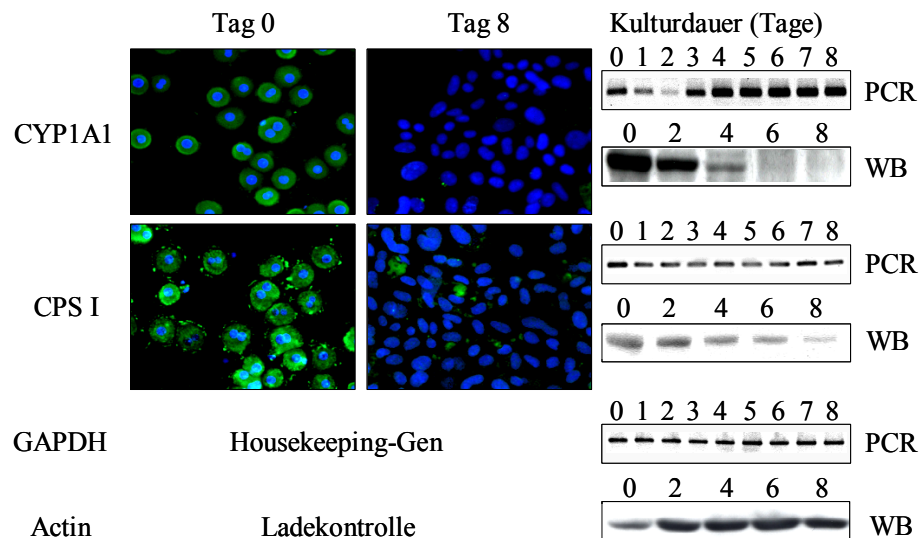


Abbildung 31: Nachweis von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) und Carbamylphosphatsynthetase I (CPS I) während der serumfreien Kultur von Rattenhepatozyten durch PCR-Analysen (PCR), Western Blot-Analysen (WB) und immuncytochemische Färbungen. In der Immuncytochemie sind die detektierten Antigene an einer grünen Fluoreszenz erkennbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau. GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Originalvergrößerung 100x

3.7 Leberrepopulation durch serumfrei kultivierte Rattenhepatozyten

Rattenhepatozyten wurden aus CD26⁺-Ratten isoliert, vier bzw. sieben Tage serumfrei kultiviert und danach in CD26⁻-Ratten transplantiert. Dieses Modell erlaubt die immunhistochemische Wiederfindung der transplantierten Zellen (CD26⁺) im Leberhintergrund der Empfängertiere (CD26⁻). Die Ektopeptidase CD26 ist ein spezifisch in der Leber auf der basolateralen Membran der Hepatozyten und der Cholangiozyten exprimiertes Protein, das die physiologische Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen anzeigt. Zur weiteren Abschätzung der Funktionalität der transplantierten Zellen wurden zusätzlich hepatozytenspezifische Proteine (PCK1, CX32) immunhistochemisch nachgewiesen.

3.7.1 Transplantation vier Tage kultivierter Hepatozyten

Vier Stunden nach Transplantation der Hepatozyten in die Leber der Empfängertiere fanden sich die transplantierten Hepatozyten im Portalsystem und den Sinusoiden der Empfängerleber. Einzelne Zellen begannen, das Endothel der Gefäße zu durchdringen und ins Parenchym einzuwandern. Die transplantierten Zellen exprimierten CD26 und CK18, aber kein CX32. Dies bestätigte die mit kultivierten Hepatozyten im Western Blot gewonnenen Daten. Die Hepatozyten der Empfängerleber dagegen exprimierten sowohl CK18 als auch CX32, jedoch erwartungsgemäß kein CD26 (Abbildung 32).

Elf Wochen nach Transplantation konnte in Serienschnitten in den Clustern, die sich aus transplantierten Hepatozyten gebildet hatten, die Expression von PCK1 nachgewiesen werden. Die Expression der PCK1 innerhalb der Leber ist heterogen, sie wird vornehmlich in den periportalen Bereichen der Sinusoide exprimiert. Da diese Orientierung der transplantierten Zellen in der Empfängerleber wiedergefunden wurde, kann man von einer korrekten topologischen Integration der transplantierten Zellen in der Empfängerleber ausgehen, was wiederum deren Funktionalität anzeigt (Abbildung 33).

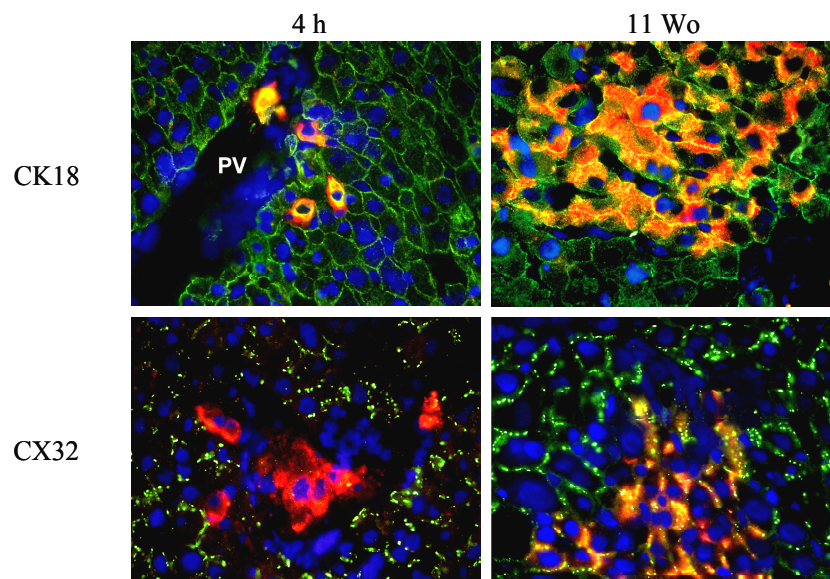


Abbildung 32: Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18 (CK18) und Connexin 32 (CX32) jeweils in Co-Lokalisation mit CD26 nach Transplantation von vier Tage serumfrei kultivierten Hepatozyten. CK18 bzw. CX32 erscheint in der Immunfluoreszenz grün, CD26 rot, die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau. Die Co-Lokalisation von CK18 bzw. CX32 mit CD26 ist an einer Gelbfärbung im Overlay zu erkennen. Die Zeitangaben entsprechen dem Zeitraum zwischen Hepatozytentransplantation und Entnahme der Leber. Originalvergrößerung 400x, PV = Portalvene

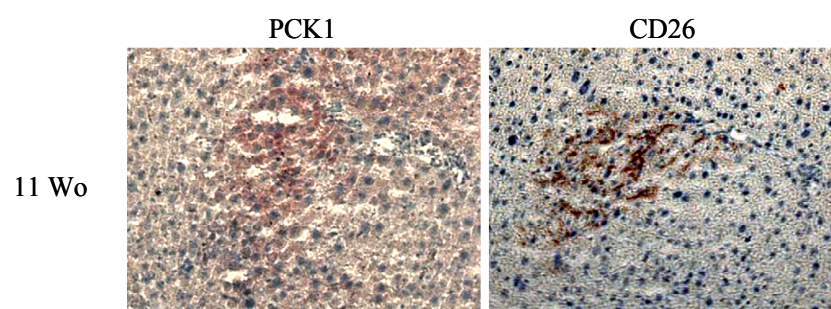


Abbildung 33: Serienschritt zur Co-Lokalisation von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (PCK1, links) und CD26 (rechts) nach Transplantation von vier Tage serumfrei kultivierten Hepatozyten. In der immunhistochemischen Färbung erscheinen die Antigene braun. Die Schnitte wurden mit Hematoxylin gegengefärbt, die Zellkerne erscheinen daher blau. Originalvergrößerung 100x

3.7.2 Transplantation sieben Tage kultivierter Hepatozyten

Nach 7-tägiger Kultur konnte in den kultivierten Hepatozyten keine CX32-Expression mehr nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 30). Innerhalb drei Wochen nach Transplantation war die CX32-Expression in den transplantierten Hepatozyten in der Empfängerleber wieder nachweisbar. Erkennbar wurde dies an der Co-Lokalisation von CD26 und CX32. Nach weiteren fünf Wochen waren größere CD26⁺-Zellcluster zu beobachten. Die Zellen in diesen Clustern exprimierten sowohl CK18 als auch CX32 (Abbildung 34). Diese Daten zeigen, dass in sieben Tage kultivierten Rattenhepatozyten, die einen deutlichen Funktionsverlust während der serumfreien Kultur erleiden, nach Transplantation hepatozytenspezifische Funktionen wiederhergestellt werden können. Darüber hinaus sind diese Zellen nach Transplantation in eine Empfängerleber immer noch zur Proliferation fähig, eine Eigenschaft, die sie nach sieben Tagen serumfreier Kultur nicht mehr zeigten (vgl. Abbildung 22).

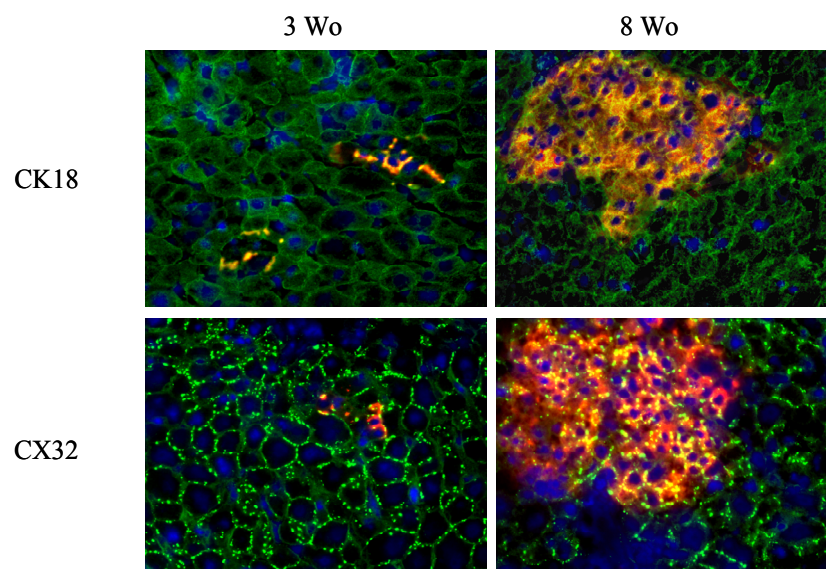


Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18 (CK18) und Connexin 32 (CX32) jeweils in Co-Lokalisation mit CD26 nach Transplantation von sieben Tage serumfrei kultivierten Rattenhepatozyten. CK18 bzw. CX32 erscheinen in der Immunfluoreszenz grün, CD26 rot, die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau. Die Co-Lokalisation von CK18 bzw. CX32 mit CD26 ist an einer Gelbfärbung im Overlay zu erkennen. Die Zeitangaben entsprechen dem Zeitraum zwischen Hepatozytentransplantation und Entnahme der Leber. Originalvergrößerung 100x

3.8 Genexpressionsanalysen unter Verwendung von Microarrays

Die Microarray-Technologie ermöglicht es, gleichzeitig die Expression mehrerer Tausend Gene auf mRNA-Ebene zu analysieren. Vor allem in Pharmakologie und Toxikologie, aber auch in Diagnostik und medizinischer Grundlagenforschung stellen Microarray-Analysen ein wichtiges Hilfsmittel dar (Burgess 2001). So gelang es beispielsweise, mittels Microarray-Analysen Krankheits-relevante Gene der rheumatoiden Arthritis zu identifizieren (Heller *et al.* 1997). Alizadeh und Staudt generierten einen sogenannten „Lymphochip“, mit dem es möglich war, alle zum damaligen Zeitpunkt bekannten Formen der Leukämie zu differenzieren (Alizadeh *et al.* 1999). Selbst im Screening Neugeborener auf Erbkrankheiten können Microarrays eingesetzt werden (Dobrowolski *et al.* 1999).

***In vitro*-Genexpression in proliferierenden und nicht-proliferierenden Rattenhepatozyten**

In der Literatur finden sich nur wenige Publikationen über die Genexpression von Rattenhepatozyten *in vitro*. Vor allem wurden Effekte der Zellkultur auf die Expression metabolisch relevanter und damit für Pharmakologie/Toxikologie interessanter Gene evaluiert. Zum Beispiel untersuchten Baker *et al.* 2001 die Änderungen in der Genexpression Kurzzeit-kultivierter (72 h) primärer Rattenhepatozyten. Boess *et al.* 2003 stellten vergleichende Untersuchungen zur Genexpression *in vivo*, in Monolayer- und Sandwich-Kulturen primärer Rattenhepatozyten, in hepatischen Zelllinien und in Präzisionsschnitten an. In Bezug auf Proliferation dürften sich interessante Daten hauptsächlich in den Arbeiten zu Genexpressionsanalysen in der Leber nach partieller Hepatektomie finden lassen.

In einem ersten Experiment wurde die *in vitro*-Genexpression in proliferierenden (drei Tage kultiviert) und nicht-proliferierenden Hepatozyten (acht Tage kultiviert) untersucht. Ziel war dabei die Identifikation derjenigen Gene, die für die Proliferation *in vitro* relevant sein könnten.

***In vivo*-Genexpression in G₀-Rattenhepatozyten und proliferierenden Ovalzellen**

In der gesunden, nicht manipulierten Leber besteht nur ein geringer Zell-Turnover. Nur etwa 0,001-0,01% der Hepatozyten sind mitotisch aktiv (Koniaris *et al.* 2003), die anderen Hepatozyten befinden sich in der G₀-Phase des Zellzyklus. Unmittelbar nach der Zellisolierung (vgl. Abschnitt 2.2.1.1) wurden die Hepatozyten abzentrifugiert und in TRIzol[®] lysiert. Die so gewonnene RNA diente als Referenz-RNA nicht-proliferierender Hepatozyten.

Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass bereits durch die Zellisolierung Änderungen in der Genexpression hervorgerufen worden sein könnten.

Bei einem Verlust an Leberzellen durch hepatotoxische Substanzen (z.B. CCl₄ oder Alkaloide) werden die Hepatozyten abgetötet und/oder an der Proliferation gehindert. Trotz vorhandenem Proliferationsstimulus können sie die Leber nicht mehr regenerieren. Jetzt werden Vorläuferzellen, sogenannte Ovalzellen, aktiviert. Diese Ovalzellen proliferieren zunächst und differenzieren dann in Hepatozyten oder Cholangiozyten. Der Vergleich proliferierender Hepatozyten *in vitro* mit proliferierenden Ovalzellen *in vivo* basiert auf der Annahme, dass in beiden Zellpopulationen die gleichen proliferationsrelevanten Gene aktiv sein könnten, so dass sich die Expressionsprofile diesbezüglich ähneln müssten. Die Genexpressionsanalysen von kultivierten Rattenhepatozyten (3d vs. 8d) sowie nicht-proliferierenden Rattenhepatozyten (*in vivo*) vs. proliferierende Ovalzellen (*in vivo*) wurden deshalb nicht einzeln betrachtet, sondern vergleichend analysiert.

Ausgewählte Ergebnisse der Microarray-Analysen

Insgesamt waren auf den verwendeten Microarrays (Ratten-10k-Array, MWG Biotech) Sonden für 9715 verschiedene Gene vorhanden. Die darunter befindlichen 3630 ESTs¹³ wurden aufgrund der unzureichenden Charakterisierung der korrespondierenden Gene nicht weiter berücksichtigt. Einen auszugsweisen Überblick über die Ergebnisse der Microarray-Analysen gibt Tabelle 2. Dieser Tabelle liegt eine Einteilung der Gene in die Kategorien Proteine der extrazellulären Matrix (ECM-Proteine), Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs), Nichtparenchym- und Progenitorzellmarker, hepatozytenspezifische Marker und Sonstige zugrunde.

Die Auswertung der Microarrays lieferte aber auch für Kontroll-Spots (Arabidopsis-Gene) und für leere Spots (Blanks) Messwerte. Dies deutet auf Fehlhybridisierungen bzw. unzureichende Waschschrte während der Arrayanalyse hin. Zur Bestätigung ausgewählter Microarray-Ergebnisse wurden semi-quantitative PCR-Analysen durchgeführt. Wie in Tabelle 3 gezeigt, konnten zumeist die Unterschiede in der mRNA-Expression aus den Microarray-Analysen bestätigt werden. Allerdings stimmten die Ergebnisse nicht immer

¹³ ESTs (expressed sequence tags) sind ca. 300-500 bp lange, zufällige cDNA-Fragmente, die einen Abschnitt aus der kodierenden Region eines Genes repräsentieren. Die Funktion des entsprechenden Genes ist damit aber noch nicht bekannt.

überein, so z.B. für MMP9. Die Ratios von 0,75 (Kultur 3d vs. 8d) bzw. 0,65 (OZ vs. RH) ließen hier auf eine Up-Regulation zum Ende des Kulturzeitraumes bzw. bei Rattenhepatozyten *in vivo* schließen. Durch die PCR wurde jedoch eine Down-Regulation detektiert. Wenn man die Rohdaten der einzelnen Microarrays prüft, zeigt sich für die kultivierten Hepatozyten, dass viermal eine Up-Regulation und zweimal eine Down-Regulation detektiert wurde. Für das Ovalzellexperiment wurde fünfmal eine Up-Regulation und nur einmal eine Down-Regulation gefunden. Im Zuge der Mittelwertbildung (vgl. Abschnitt 2.2.12) wurde dann eine mittlere Ratio gebildet. Dies führte in einzelnen Fällen, wie hier für MMP9, sicherlich zu falsch positiven Ergebnissen. In Anbetracht der auf den Microarrays detektierten Blanks und Arabidopsis-Kontrollen erscheinen die PCR-Ergebnisse daher vertrauenswürdiger.

Gene/funktion	Ratios 3d/8d							Ratios OZ/RH						
	Präparation 1		Präparation 2		Präparation 3		Ratio	Ratio	Präparation 1		Präparation 2		Präparation 3	
	C3/C5	C5/C3	C3/C5	C5/C3	C3/C5	C5/C3			C3/C5	C5/C3	C3/C5	C5/C3	C3/C5	C5/C3
Proteine der extrazellulären Matrix (ECM)														
α1 type v collagen	0.06	0.67	0.05	1	0.05	0.34	0.13	1.49	0.93	1.19	1	9.59	1.16	0.60
α1-viii collagen	0.22	1.62	1.34	1	0.01	0.01	0.13	0.75	0.79	0.70	1	3.62	0.22	0.52
α1 type i collagen	0.01	0.07	0.00	0.06	0.00	0.91	0.03	4.50	6.77	1.05	14.65	2.48	4.42	7.35
α2 collagen type iv	1.05	0.61	1.77	0.54	2.33	0.55	0.96	2.17	1.59	0.64	1.16	4.78	25.22	0.72
α3 type iv collagen	2.02	0.86	1	1	5.16	1	2.08	1.22	0.99	0.63	1	1	9.26	0.39
collagen α1 ix	1.82	0.62	1	0.05	1	0.38	0.37	0.71	0.87	0.74	1.29	11.56	7.21	0.00
collagen α 1 type x	3.67	0.56	2.97	0.43	3.02	1.09	1.44	0.89	0.58	1.09	1	1	0.41	2.43
collagen α1 xi	0.05	0.00	0.76	1	0.11	0.24	0.09	0.47	0.73	1.33	1	1	1	0.11
collagen α2 type v	0.02	0.27	0.04	1	0.02	0.59	0.07	2.95	1.06	1.02	4.72	82.60	2.15	0.73
collagen type α1 xi	2.85	0.50	1	1	1.16	0.56	0.98	0.43	0.67	0.87	1.16	1	3.91	0.01
collagen xii α1	0.06	0.78	0.05	0.20	0.10	0.52	0.17	1.92	1.29	1.07	1.21	3.14	2.74	3.52
collagen xviii	0.17	3.41	0.19	1.12	0.51	1.85	0.70	1.29	0.91	0.55	0.90	0.24	18.46	2.35
entactin	0.73	1.80	1.66	0.21	0.49	0.72	0.74	5.33	4.23	0.72	10.04	11.23	11.84	5.67
laminin γ1	0.29	3.07	0.37	1.51	1.13	2.89	1.08	3.51	3.10	0.96	5.45	15.56	25.60	0.29
fibronectin, precursor	0.28	13.17	0.00	0.70	0.37	0.57	0.28	0.95	0.78	0.80	0.50	0.99	1.39	1.64
fibronectin, precursor	0.90	2.72	0.23	3.66	0.31	1.10	0.95	0.59	0.86	0.99	0.81	1	1	0.17
tenascin	0.53	1.19	1	0.09	0.18	0.20	0.29	1.51	0.55	1.17	1	7.67	1.49	1.08
vitronectin	0.19	3.01	0.59	4.22	0.22	1.72	0.91	0.22	0.19	10.54	0.02	0.80	0.05	0.09
Matrix gla protein precursor	0.28	4.00	0.34	1.92	0.09	0.31	0.52	9.17	4.72	2.03	4.10	60.55	80.46	3.10
Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs)														
MMP 2 (gelatinase a)	0.06	0.15	0.43	1	0.11	1	0.15	3.53	5.17	0.71	4.88	30.27	2.77	1.27
MMP 7 (matrilysin)	4.83	0.05	3.34	0.50	1.94	0.49	0.84	0.90	0.59	1.27	1	1	3.77	0.23
MMP 9 (gelatinase b)	0.36	2.21	0.66	0.63	0.36	1.50	0.75	0.65	0.55	0.85	0.28	1.02	2.11	0.28
MMP 11 (stromelysin 3)	0.59	1.31	37.85	1	0.58	0.28	1.37	1.22	0.77	0.69	1	1	1.66	2.47
MMP 12	1.23	0.27	1	1.03	1.83	1.21	0.95	2.01	2.78	1.49	1.25	1	4.17	1.52
MMP 13 (collagenase)	1.71	1.28	9.06	1	1	1	2.71	1.22	0.90	0.77	1	1.89	1.71	1
MMP 14 (mt-MMP29)	3.31	1.07	1	1	0.78	1	1.40	1.10	0.47	0.96	1	1	8.92	0.36
MMP 23	0.08	0.18	0.19	1	0.12	0.72	0.19	1.50	1.19	0.88	6.23	7.92	2.58	0.09
MMP 24 (mt5-MMP)	0.19	2.11	0.63	2.21	0.82	2.77	1.04	0.83	1.66	0.63	1.01	1.65	0.56	0.33
TIMP 1	0.11	0.99	0.21	1.07	0.41	2.29	0.53	9.58	1.33	1.15	65.37	141.45	7.64	7.15
TIMP 1	0.12	1.61	0.20	1.06	0.37	1.95	0.56	8.08	4.39	0.82	26.43	112.03	20.47	1.27
TIMP 2	0.03	0.40	0.08	1	0.22	1.14	0.19	1.17	0.82	0.87	1	3.69	1	0.70
TIMP 3	1.82	1.06	1.93	0.08	25.73	0.53	1.27	0.75	0.66	1.00	0.45	1	9.65	0.08
Nichtparenchym- und Progenitorzellmarker														
keratin 19	0.07	0.24	0.02	0.02	0.02	0.57	0.06	1.31	1.02	0.75	2.22	9.80	8.14	0.04
keratin 19	0.10	1.95	0.02	0.08	0.02	0.17	0.10	2.16	2.61	0.72	2.12	2.57	2.15	4.58
connexin 43	0.13	0.76	0.27	0.65	0.09	0.32	0.28	5.09	2.88	1.05	16.08	5.86	55.99	1.10
desmin	0.32	0.23	1.16	1	0.11	1	0.31	4.15	0.85	1.05	1	13.76	114.81	0.87
glial fibrillary acidic protein α	1.79	0.57	11.96	1	25.92	1	4.22	1.38	0.62	1.13	0.46	2.25	21.00	0.46
nestin	0.11	0.92	0.0361	1	0.17	0.60	0.21	1.21	0.89	0.92	0.86	13.62	2.81	0.12
vimentin	0.06	0.92	0.02	0.14	0.07	0.71	0.14	4.45	5.06	1.14	4.78	3.87	17.15	4.24
platelet-endothelial cell adhesion molecule	0.52	1.53	1.56	0.26	1.02	0.3	0.69	1.83	1.29	1.02	1	3.90	13.01	0.31
thymus cell surface antigen (thy1)	0.58	0.28	0.39	1.87	0.23	0.61	0.51	4.12	4.25	1.17	21.79	10.76	3.58	1.18
hepatozytenspezifische Marker														
cytokerin 18	0.27	6.40	0.30	1.81	0.86	4.80	1.26	0.98	1.82	0.96	0.34	0.43	1.94	1.73
keratin 18	0.21	6.17	0.42	2.80	0.92	2.77	1.25	0.56	0.58	0.70	0.35	0.94	1	0.40
tgf β receptor i	1.25	0.19	2.63	0.27	0.46	0.55	0.60	1.53	0.96	0.90	1	5.94	0.47	3.44
tgf β receptor ii	2.11	2.86	6.27	0.01	6.06	1	1.21	0.91	0.92	0.88	1	1	2.69	0.31
tgf β receptor iii	1.29	1.72	4.37	1.94	7.47	0.55	2.07	0.64	0.66	0.57	0.63	0.97	4.36	0.07
tnf receptor ii	4.80	1.06	3.94	0.22	1.84	0.10	0.98	1.67	0.85	0.65	1	2.51	32.00	0.28
alpha-2-macroglobulin	0.04	0.39	0.05	0.15	0.11	1.12	0.15	2.09	4.07	0.90	0.99	4.22	4.38	0.57
c-reactive protein	0.14	1.64	0.23	1.44	0.48	1.92	0.64	0.17	0.29	0.39	0.05	0.28	0.27	0.37
cytochrome p450 cyp2b3	0.15	3.77	0.18	0.13	0.11	0.32	0.28	0.24	0.18	7.53	0.09	0.13	0.13	0.04
cytochrome p450 cyp2j3	1.18	1.12	0.71	3.59	1.62	2.80	1.57	0.21	1.03	0.82	1.69	1.86	0.79	0.02
cytochrome p450 cyp1a1	1.66	1.61	0.70	1	0.28	1	0.85	0.72	0.17	0.54	0.04	0.26	0.11	0.11
glutathione s-transferase	0.28	1.74	0.44	2.48	0.64	3.89	1.05	0.15	0.93	0.66	1.50	1.96	3.37	2.20
hepatocyte nuclear factor 3 γ	1.18	4.39	4.92	0.76	1.07	0.57	1.51	0.79	0.43	0.76	0.22	0.21	0.16	0.68
hepatic nuclear factor 4α	5.95	0.49	1.13	1.15	6.04	0.39	1.45	1.36	0.67	1.00	2.42	3.61	3.42	0.31
hepatic nuclear factor 4α	0.60	2.27	2.65	1.05	0.41	1.04	1.09	0.91	2.68	0.17	1	1	3.80	0.37
transferrin	0.12	1.62	0.17	1.29	0.23	3.58	0.57	0.19	0.25	0.30	0.02	0.04	0.12	0.14
connective tissue growth factor	0.08	0.67	0.03	0.27	0.12	0.51	0.17	1.83	0.45	0.75	0.06	0.15	0.08	0.10
phosphoenolpyruvate carboxykinase	2.58	0.61	10.91	1	1	1	2.57	0.39	0.08	0.69	0.03	0.05	0.03	0.07
carboxymyl-phosphate synthetase 1	0.97	2.15	1	1.74	1	7.60	2.29	0.07	4.07	0.90	0.99	4.22	4.38	0.57
Sonstige														
forkhead box m1	2.53	1.17	3.19	1.70	1	1	2.00	1.31	0.92	0.74	16.26	3.36	0.49	0.27
hgf receptor	0.87	1.49	1.33	0.85	0.61	0.79	0.95	0.64	0.51	0.67	0.41	1	6.31	0.12
egf receptor	0.82	5.90	3.07	0.20	1.60	0.37	1.10	0.61	0.72	1.20	0.52	0.56	1	0.31
proliferating cell nuclear antigen (pcna)	0.36	2.92	0.89	4.64	0.81	3.59	1.53	1.99	2.32	1.04	14.93	4.11	0.65	0.64
dipeptidyl peptidase 4 (CD26)	0.43	3.12	0.92	3.14	1.23	2.98	1.56	0.95	0.47	0.96	0.20	1.44	9.79	0.54

Tabelle 2: Auszug aus den Ergebnissen der Microarray-Analysen. Für die blau markierten Gene wurden die Ratios durch semi-quantitative PCR überprüft.

1: nicht detektierbar

Gen	R1		R2		R3		OZ1		OZ2		Ratio	OZ/RH
	3d	8d	3d	8d	3d	8d	OZ	RH	OZ	RH	3d/8d	
Proteine der extrazellulären Matrix (ECM)												
α_1 Typ I Kollagen											0,03	4,50
α_2 Typ V Kollagen											0,07	2,95
Fibronectin											0,28/0,95	0,59/0,95
Vitronectin											0,91	0,22
Matrixmetalloproteinase (MMP und deren Inhibitoren (TIMPs))												
MMP2											0,15	3,53
MMP9											0,75	0,65
MMP13											2,71	1,22
TIMP1											0,53/0,56	9,58/8,08
TIMP2											0,19	1,17
TIMP3											1,27	0,75
Nichtparenchym- und Progenitorzellmarker												
CK19											0,06/0,10	1,31/2,16
Cx43											0,28	5,09
Desmin											0,31	4,15
α SMA											---*	---*
Nestin											0,21	1,21
Vimentin											0,14	4,45
Thy1											0,51	4,12
hepatozytenspezifische Marker												
CK18											1,25/1,26	0,56/0,98
Cx32											---*	---*
HNF4 α											1,09/1,45	0,91/1,36
Transferrin											0,57	0,19
PCK1											2,57	0,39
Sonstige												
Fox m1											2,00	1,31
HGF-Rezeptor											0,95	0,64
EGF-Rezeptor											1,10	0,61
CD26											1,56	0,95
18S-RNA											---*	---*

Tabelle 3: Darstellung ausgewählter Ergebnisse aus Microarray-Analyse und semi-quantitativer PCR, R1, R2, R3 Präparationen von Rattenhepatozyten (RH), OZ1, OZ2 Präparationen von Ovalzellen (OZ)
* nicht auf den Arrays enthalten

Die Microarray-Experimente lieferten umfangreiche Daten zur Genexpression, auf die jedoch aufgrund der dieser Arbeit zugrunde liegenden Aufgabenstellung nur auszugsweise eingegangen werden kann. Es werden daher nachfolgend nur jene Gene näher diskutiert, für die ein direkter Einfluss auf das Proliferationsverhalten *in vitro* angenommen wird.

3.8.1.1 Matrix/TIMPs und Nichtparenchym-/Progenitorzellmarker

Eine Vielzahl von Genen, verantwortlich für die Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix, war sowohl zum Ende der Kultur als auch in Ovalzellen up-reguliert. Gene für Matrixmetalloproteinasen waren up- und down-reguliert. Teilweise waren auch die Gene für die TIMPs (Inhibitoren der Metalloproteinasen) up-reguliert. Diese Ergebnisse wurden in den durchgeführten PCR-Analysen weitgehend bestätigt. Es blieb also zu klären, ob auch die entsprechenden Matrixproteine exprimiert und auf den Hepatozyten abgelagert wurden. Dazu wurden von den Rattenhepatozyten am dritten und achten Kulturtag rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zwar zeigten die Hepatozyten am Tag 8 der Kultur deutlich mehr Mikrovilli als am dritten Kulturtag, es waren aber praktisch keine fibrillären Strukturen zu beobachten, wie sie z.B. von Kollagen des Typs I und V gebildet werden würden (Amenta *et al.* 1997).

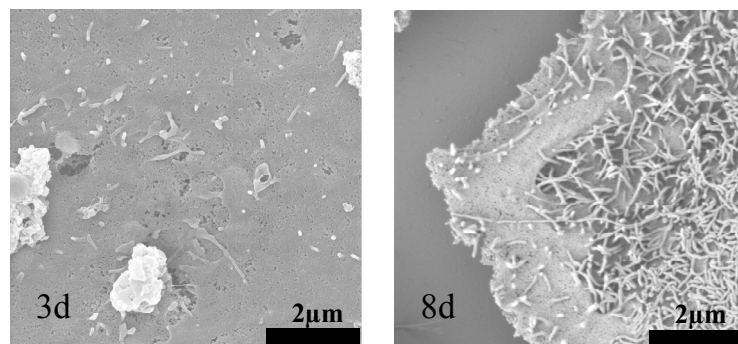


Abbildung 35: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen serumfrei kultivierter Rattenhepatozyten am Tag 3 (links) und Tag 8 (rechts) der Kultur

Im Verlauf der Zellkultur wurde ebenfalls die Zunahme der mRNA-Expression für Marker von Nichtparenchym- bzw. Progenitorzellen beobachtet. Daraus könnte man schließen, dass die Hepatozyten im Kulturverlauf Progenitorzellcharakter annahmen. Das wird auch dadurch unterstützt, dass diese Marker in Ovalzellen deutlich stärker exprimiert werden, als in adulten Hepatozyten. Während die mRNA des α SMA (alpha smooth muscle actin), einem Marker für dedifferenzierte Ito-Zellen, im Verlauf der Kultur unverändert blieb, nahm die

mRNA-Expression für Desmin, einem Marker für differenzierte Ito-Zellen, deutlich zu (vgl. Abbildung 36). Zunächst wurden zusätzlich Western Blot-Analysen durchgeführt, um die Expression der korrespondierenden Proteine zu untersuchen. Dabei konnte am Tag 3 der Kultur weder α SMA noch Desmin detektiert werden, am achten Kulturtag war jedoch ein deutlicher Nachweis beider Proteine möglich. Ito-Zellen gelten als die Hauptproduzenten der Proteine der ECM (Arnaud *et al.* 2003b, Knittel *et al.* 1999, Vickers *et al.* 2004). Deshalb wurden immuncytochemische Färbungen angefertigt, um Ito-Zellen in den Hepatozytenkulturen nachweisen zu können. Diese Färbungen der Rattenhepatozytenkulturen zeigten am Tag 3 der Zellkultur vereinzelte Ito-Zellen. Am Tag 8 der Kultur waren deutlich mehr Desmin⁺-Zellen (differenzierte Ito-Zellen) und auch deutlich mehr α SMA⁺-Zellen (dedifferenzierte Ito-Zellen) zu beobachten. Zur Untersuchung des Differenzierungsstatus der kultivierten Rattenhepatozyten wurde auch eine Färbung für einen hepatozytenspezifischen Marker (anti-human hepatocyte-Antigen) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sowohl am Tag 3 und am Tag 8 der Kultur das entsprechende Antigen nachweisbar war.

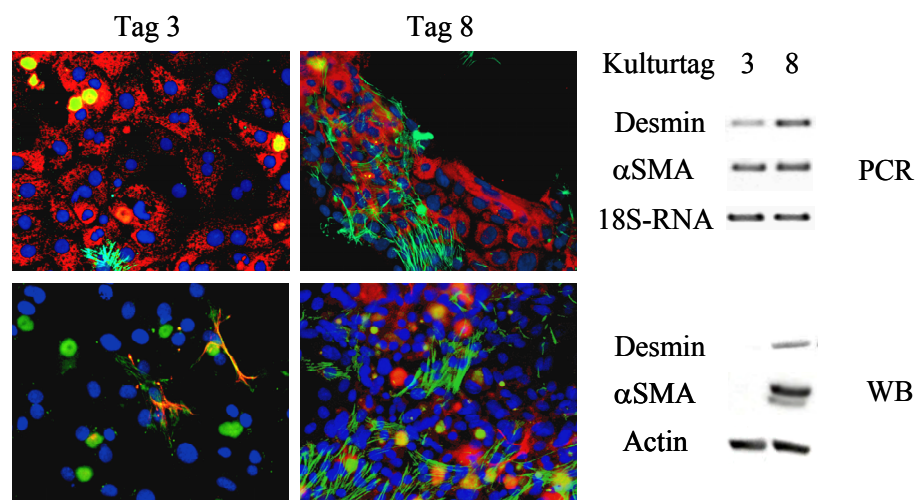


Abbildung 36: PCR- und Western Blot-Analysen (WB) sowie immuncytochemische Färbungen von Rattenhepatozyten nach drei bzw. acht Tagen serumfreier Kultur.

Oben: Co-Lokalisation α SMA (grün) und anti-human hepatocyte (rot)

Unten: Co-Lokalisation von α SMA (grün) und Desmin (rot)

Die Co-Lokalisation von α SMA und dem anti-human hepatocyte-Antigen bzw. Desmin ist im Overlay an einer Gelbfärbung zu erkennen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau. Originalvergrößerung 100x. Als Housekeeping-Gen wurde in der PCR 18S-RNA mitgeführt, als Ladekontrolle in den Western Blot-Analysen diente Actin.

3.8.1.2 Sonstige

Dem Kulturmedium wurden EGF und HGF als Wachstumsfaktoren zugesetzt. Über die Kulturdauer blieb die mRNA-Expression für die Rezeptoren dieser Zytokine relativ konstant. Runge *et al.* 1999 berichteten, dass während 12-tägiger serumfreier Kultur beide Zytokinrezeptoren auf den Zellmembranen exprimiert wurden, wenn auch mit geringfügig abnehmender Tendenz. Man kann daher davon ausgehen, dass die Proliferation der Hepatozyten zum Ende des Kulturzeitraumes nicht primär dadurch terminiert wurde, dass keine Rezeptoren mehr für diese Zytokine exprimiert wurden. Im Vergleich Ovalzelle vs. Hepatozyten zeigten sich etwas größere Unterschiede in der mRNA-Menge für beide Rezeptoren. In den Ovalzellen wurde jeweils weniger mRNA für den EGF- und HGF-Rezeptor detektiert, als in den G₀-Hepatozyten.

Sowohl in den Microarray-Analysen als auch in den PCRs wurde eine deutliche Down-Regulation für das Gen des Transkriptionsfaktors Fox m1 nachgewiesen. Auf die Bedeutung von Fox m1 für die Zellproliferation wurde im Abschnitt 2.2.13 bereits eingegangen. Während der Transkriptionsfaktor in G₀-Hepatozyten erwartungsgemäß kaum exprimiert wurde, war eine starke Expression in den proliferierenden Ovalzellen zu beobachten. Daher erschien das Fox m1-Gen als ein vielversprechender Kandidat, aus dessen gezielter Beeinflussung eine verbesserte *in vitro* Proliferation resultieren könnte.

Transfektion primärer Rattenhepatozyten mit dem Fox-GFP-Konstrukt

In Anbetracht der Rolle des Fox m1 in der Proliferation lässt dessen Down-Regulation am Tag 8 der Zellkultur einen kausalen Zusammenhang mit dem Proliferationsstopp *in vitro* vermuten. Durch eine Transfektion des humanen Homologs zum Fox m1, dem Fox m1b, und der damit verbundenen Transgen-Expression sollte diese Hypothese überprüft werden. Dazu wurden Rattenhepatozyten am Tag 1 der Kultur mit einem Konstrukt aus GFP und Fox m1b transfiziert. Nach der Transfektion konnten insgesamt nur sehr wenig transfizierte Hepatozyten beobachtet werden. Es gab keinerlei Anzeichen für ein lokal gehäuftes Auftreten GFP-exprimierender Zellen, die vermuten lassen würden, dass diese aus einer einzigen, sich teilenden Zelle hervorgegangen sein könnten. Selten waren zwei unmittelbar nebeneinander befindliche GFP-exprimierende Hepatozyten zu beobachten (vgl. Abbildung 37). Die GFP-Expression in den transfizierten Zellen konnte über mindestens vier Tage beobachtet werden, es ließen sich aber keine Anzeichen für eine signifikant verbesserte Proliferation durch transgene Fox m1b-Expression erkennen.

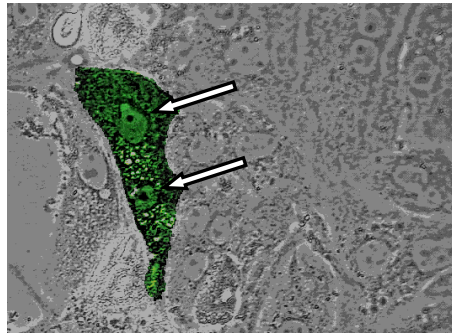


Abbildung 37: Overlay von Hellfeld- und Fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahme Fox-GFP-transfizierter Rattenhepatozyten am Tag 3 der serumfreien Kultur (48 h nach Transfektion) Originalvergrößerung 200x. Die Pfeile zeigen auf die Zellkerne.

Zusammenfassung

Primäre Rattenhepatozyten konnten unter serumfreien Bedingungen 3-fach propagiert werden, bevor ein Proliferationsstopp eintrat. Harnstoffsyntheserate, EROD- und PROD-Aktivität blieben in der Kultur zunächst einige Tage stabil und sanken dann deutlich ab. Der Zusatz entsprechender Induktoren konnte diesen Funktionsverlust verhindern und einen Zuwachs an Funktionalität bewirken. Die Ursachen für den Proliferationsstopp in der Zellkultur konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Einerseits fand sich eine Down-Regulation des Transkriptionsfaktors Fox m1, andererseits waren in den Hepatozytenkulturen kontaminierende Ito-Zellen nachweisbar, die einen cytostatischen Effekt auf die Hepatozyten haben können. Durch Transplantation kultivierter Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass *in vitro* verloren gegangene Eigenschaften (Proliferationsfähigkeit, hepatozytäre Marker) unter den Bedingungen der Empfängerleber erneut ausgebildet werden.

4 Diskussion

Die begrenzte Verfügbarkeit von Spenderlebern macht die Hepatozytentransplantation zu einer Alternative in der Therapie von Lebererkrankungen. Das Verfahren ist minimal invasiv und belastet den Patienten im Vergleich zur Organtransplantation deutlich weniger. Es ist damit auch bei Patienten anwendbar, die aufgrund anderer Grunderkrankungen, wie z.B. koronarer Herzerkrankungen, nur schwer oder gar nicht einer Lebertransplantation unterzogen werden können. Voraussetzung für eine erfolgreiche Zelltherapie bei Lebererkrankungen ist der funktionelle Ersatz des erkrankten Lebergewebes des Empfängers durch die transplantierten Hepatozyten. Dies wiederum kann nur erfolgreich sein, wenn einerseits die Proliferation der transplantierten Hepatozyten im Empfängergewebe und damit der Ersatz der Wirtshepatozyten durch die Spenderhepatozyten sowie der Funktionserhalt der transplantierten Zellen im Empfängergewebe gewährleistet sind. Zur Sicherung ausreichender Ressourcen ist die Propagation der Zellen unter serumfreien Bedingungen vor der Transplantation erforderlich, die allerdings mit einer Abnahme der proliferativen Kapazität und funktionellen Eigenschaften einhergeht, wie die hier erhobenen Befunde zeigen. Man kann jedoch davon ausgehen, dass Hepatozyten, selbst wenn sie in Kultur nicht weiter proliferieren und teilweise ihre hepatozytenspezifischen Eigenschaften verlieren, die Empfängerleber nach Transplantation funktionell besiedeln, wie die durchgeführten Transplantationsexperimente im Rattenmodell gezeigt haben. Dies ist vermutlich auf die Bereitstellung adäquater Stimuli und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte in der Empfängerleber zurückzuführen.

4.1 Determinanten der proliferativen Kapazität serumfrei kultivierter Hepatozyten

4.1.1 Zelluläre Faktoren

In Abhängigkeit von der Spezies, aus der die Hepatozyten isoliert wurden, war ein unterschiedliches Proliferationspotential der kultivierten Zellen zu beobachten. Während der Primärkultur konnte die Zellzahl bei Rattenhepatozyten etwa verdreifacht werden, bei porcinen Hepatozyten wurde die Zellzahl etwa verfünffacht, bei humanen Hepatozyten blieb die Zellzahl konstant.

Der BrdU-Einbau von Ratte und Schwein war quantitativ und zeitlich sehr ähnlich, im Vergleich dazu war der BrdU-Einbau in humanen Hepatozyten ausgesprochen gering. Unterschiede in Thymidineinbau und Proliferation berichteten auch Wegner *et al.* 1992. Bei Kultur mit EGF und Insulin war der Thymidin-Labeling Index in kultivierten Schweinehepatozyten doppelt so hoch wie in Rattenhepatozyten. In der Folge kam es bei den

Rattenhepatozyten auch nur zu einem moderaten Anstieg der Zellzahl, während porcine Hepatozyten deutlich besser proliferierten. Ismail *et al.* 1991 fanden bei Rattenhepatozyten einen 5-10-fach höheren Thymidineinbau im Vergleich zu humanen Zellen. Die Ursache für die unterschiedliche Proliferation von Ratten- und Schweinehepatozyten könnte in einer unterschiedlichen Sensibilität gegenüber Kontaktinhibierung liegen (Wegner *et al.* 1992). Kontaktinhibierung ist die phänomenologische Beschreibung für einen Proliferationsstopp, der im Laufe der Kultur vieler Zellen beobachtet wurde. Sobald die Zellen Kontakt untereinander haben, endet die Proliferation. Die biologischen Ursachen dafür sind aber bisher weitgehend unbekannt. Sowohl Ratten- als auch Schweinehepatozyten hatten bereits am zweiten Kulturtag Zellkontakt zu benachbarten Zellen, trotzdem kam es bei porcinen Hepatozyten erst bei hoher Konfluenz zum Stopp der Proliferation.

4.1.1.1 Alter, Polyploidie und Telomerlänge

Ratten- und Schweinehepatozyten proliferierten in der Kultur, während humane Hepatozyten in der Kultur nicht vermehrt werden konnten. Ursache dafür könnte das biologische Alter der Tiere im Gegensatz zum Alter der humanen Zellspender sein. Für die Isolierung tierischer Hepatozyten wurden juvenile Tiere verwendet, wohingegen die humanen Hepatozyten von Spendern im Alter von 51-69 Jahren stammten. In der Literatur findet sich eine Reihe von Arbeiten zur Abhängigkeit der Proliferation humaner Hepatozyten vom Spenderalter (Walldorf *et al.* 2004, Block *et al.* 1996, Wege *et al.* 2003). Mit dem normalen Alterungsprozess sind in Hepatozyten mehrere Phänomene verbunden. So erhöht sich *in vivo* mit zunehmendem Lebensalter der Ploidiegrad der Hepatozyten, ein höherer Ploidiegrad korreliert dabei mit einer verminderten Proliferationskapazität (Kudryavtsev *et al.* 1993, Gupta 2000). Bei einem entsprechenden Proliferationsreiz treten Hepatozyten mit einem höheren Ploidiegrad später in den Zellzyklus ein (Seglen 1997). In den mehrfach passagierten Schweinehepatozyten konnte eine Zunahme des zellulären DNA-Gehaltes bei gleichzeitiger Abnahme der proliferativen Kapazität beobachtet werden (vgl. Abbildung 16). Gorla *et al.* 2001 fanden in fünf Tage kultivierten Rattenhepatozyten eine Zunahme der octoploiden Zellen. In den hier vorgestellten Experimenten wurde jedoch ein nahezu konstanter zellulärer DNA-Gehalt und damit auch ein konstanter Ploidiegrad in den kultivierten Rattenhepatozyten beobachtet (siehe Abbildung 23). Allerdings wurde für humane Hepatozyten ein Anstieg des zellulären DNA-Gehaltes und damit auch des Ploidiegrades beobachtet (vgl. Abbildung 3). Als weiterer wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Proliferationsfähigkeit von Zellen ist die Telomerlänge zu nennen. Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere, was die

Anzahl möglicher Zellteilungen grundsätzlich limitiert. Für somatische Zellen wurde eine Telomerverkürzung von 50-200 bp je Zellteilung beschrieben (Jiang *et al.* 2004, Lansdorp 2000), die nach 50-90 Zellteilungen zum Erreichen des Hayflick Limits¹⁴ führte (Shay *et al.* 2001). In Übereinstimmung dazu konnten Aikata *et al.* 2000 für adulte humane Hepatozyten *in vivo* eine durchschnittliche Telomerverkürzung von 120 bp pro Zellteilung berechnen. Jedoch zählen Hepatozyten eher zu denjenigen Zellen, die eine längere „Lebenszeit“ haben (Schmid 1999). In humaner Leber wird im Zuge des normalen Zell-Turnovers jeder Hepatozyt einmal pro Jahr ersetzt (Anantharaju *et al.* 2002); nur etwa 0,001-0,01% der Hepatozyten sind jeweils mitotisch aktiv (Koniaris *et al.* 2003). Die Zellspender waren zwischen 51 und 69 Jahre alt, das heißt, die hier verwendeten humanen Hepatozyten könnten durchaus schon 50 und mehr Zellteilungen *in vivo* durchlaufen haben. Man könnte daher vermuten, dass deren mangelnde Proliferationsfähigkeit auf die bereits vorliegende replikative Seneszenz zurückzuführen war. Wege *et al.* 2003 berichteten für fötale humane Hepatozyten, dass *in vitro* der mitotische Arrest nach 30-35 Populationsverdopplungen mit der Verkürzung der Telomerlänge auf weniger als 5 kbp einherging. Kitada *et al.* 1995 fanden bei 70-Jährigen eine durchschnittliche Telomerlänge in Hepatozyten von 8-9 kbp und Aikata *et al.* 2000 bei 80-Jährigen von 10 kbp. Diese Telomerlängen liegen deutlich über dem allgemein akzeptierten Hayflick Limit. Trotz vermutlich noch ausreichend langer Telomere konnten humane Hepatozyten *in vitro* nicht expandiert werden. Allerdings muss zusätzlich in Betracht gezogen werden, dass die Telomerlänge in Individuen biologischen Schwankungen unterliegt und dass die Telomere in chronisch entzündeten Lebern (z.B. Hepatitis) signifikant kürzer sein können, als in gesunder Leber (Ohashi *et al.* 1996). Besonders unter *in vitro*-Bedingungen erscheint es aber unwahrscheinlich, dass die Proliferation einzig und allein von der Telomerlänge determiniert wird. So wurden beispielsweise für fünfmal passagierte porcine Hepatozyten Telomerlängen bestimmt, die nur etwa 10% kürzer als bei primären Hepatozyten, aber immer noch deutlich länger als 5 kbp waren (W. Fiedler 2006, persönliche Mitteilung), dennoch proliferierten die Schweinehepatozyten nach fünf Passagen nicht mehr. Auch sind die Literaturdaten zur Korrelation von Alter und Proliferationskapazität *in vivo* nicht eindeutig. Während Nagino *et al.* 2001 in der frühen Phase der Leberregeneration nach Hepatektomie eine signifikante Abhängigkeit vom Patientenalter

¹⁴ Hayflick Limit: kritische Telomerlänge (ca. 5 kbp), die zu einem Verlust der Teilungsfähigkeit der Zelle führt

beschrieben, konnten Maas *et al.* 1993 keine Altersabhängigkeit nachweisen. Bei Ratten und Mäusen wurde eine verlangsamte Leberregeneration in alten Tieren beobachtet (Smanik *et al.* 1991, Tsukamoto *et al.* 1993, Wang *et al.* 2001, Iakova *et al.* 2003). Offensichtlich erfolgt *in vivo* eine Leberregeneration also auch in älteren Individuen, möglicherweise jedoch unvollständiger und langsamer. Welchen Beitrag dabei Vorläufer- oder Stammzellen zur Leberregeneration in fortgeschrittenem biologischen Alter leisten, ist bisher nicht publiziert. Denkbar wären aber ähnliche Mechanismen, wie sie nach einer Hepatektomie bei 2-AAF-behandelten Ratten beobachtet werden können. Hier kommt es zu einer Induktion/Aktivierung von Vorläuferzellen (Ovalzellen), die durch Proliferation und nachfolgende Differenzierung die Leber anstelle der nicht mehr teilungsfähigen Hepatozyten regenerieren (He *et al.* 2004, Petersen *et al.* 1998).

Insbesondere für Rattenhepatozyten könnten sich die Ursachen für den Proliferationsstopp *in vitro* deutlich von den anderen beiden untersuchten Spezies unterscheiden. Während für humane Hepatozyten ein in der Primärkultur zunehmender Ploidiegrad der Zellen beobachtet wurde, konnte dies bei porcinen Hepatozyten erst im Verlauf wiederholter Subkultivierung beobachtet werden. Bei Rattenhepatozyten fand sich kein erhöhter Ploidiegrad im Verlauf der Kultur. Für Nager ist bekannt, dass sie vergleichsweise lange Telomere besitzen (Shay *et al.* 2001) und zusätzlich konstante Telomeraseaktivität während der gesamten Lebenszeit aufweisen (Anantharaju *et al.* 2002). Zudem wurde in kultivierten Rattenhepatozyten eine Up-Regulation der Telomerase beschrieben (Nozawa *et al.* 1999). Weiterhin diskutierten Shay *et al.* 2001, dass Rattenzellen sehr wahrscheinlich gar keinen Mechanismus zur „Zählung“ der Zellteilungen haben, ihre Proliferationskapazität daher unabhängig von der Telomerlänge sein könnte. Kritisch verkürzte Telomere können damit ebenso wie ein hoher Ploidiegrad als Ursache für den Proliferationsstopp *in vitro* ausgeschlossen werden. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Transplantationsversuche mit kultivierten Rattenhepatozyten zeigten, dass eben jene Zellen, die in Kultur nicht mehr weiter proliferierten, nach Transplantation in die Leber einer Empfängerratte Zellcluster ausbildeten, die durch die Proliferation einzelner integrierter Zellen entstanden waren. Die Zellen waren unter entsprechenden Bedingungen also durchaus noch zur Proliferation fähig. Die molekularen Ursachen konnten bisher nicht geklärt werden. Aus den durchgeführten Expressionsanalysen kann man jedoch schließen, dass für die Proliferation kritische Proteine in Kultur nicht mehr vorhanden waren, dass jedoch die diese Proteine codierende mRNA als „backup“-System weiter vorhanden war und bei Bedarf aktiviert werden konnte.

4.1.1.2 Fox m1

Neben dem Einfluss von Telomerlänge/Telomeraseaktivität und Ploidiegrad auf die *in vitro*-Proliferation der Hepatozyten kommen auch Änderungen in der Genregulation als Ursache in Betracht. Dabei könnten sowohl proliferationsfördernde Gene down-reguliert, wie auch Inhibitoren der Proliferation up-reguliert sein, was die Proliferation der Zellen zum Ende des Kulturzeitraumes zum Erliegen bringen könnte.

Ein Beispiel für den positiven Einfluss auf die Proliferation ist der Transkriptionsfaktor Fox m1. Er gehört zur Forkhead box M1-Familie, welche mehr als 50 Mitglieder umfasst, die alle eine Rolle in der Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Transformation und in der metabolischen Homöostase spielen (Wang *et al.* 2002). In jeder bisher untersuchten, proliferierenden Zelle konnte der Transkriptionsfaktor Fox m1 nachgewiesen werden (Costa *et al.* 2003). Das schließt sowohl nicht-transformierte als auch transformierte Zellen ein. Ye *et al.* 1999 konnten in Maushepatozyten nach 2/3 Hepatektomie die erhöhte Expression des Fox m1 nachweisen. Aber auch eine ganze Reihe von Tumorzellen exprimieren Fox m1 (Kim *et al.* 2006, Okabe *et al.* 2001, Pilarsky *et al.* 2004). Als Zielgene des Fox m1 wurden u.a. die Cycline B1, B2, A2, D1 und F sowie weitere Zellzyklus-regulierende Proteine identifiziert (Costa 2005, Wang *et al.* 2001). Als Beispiele für die bedeutende Rolle des Fox m1 in der Zellproliferation sei auf die Arbeiten von Kim *et al.* 2006 und Wonsey *et al.* 2005 verwiesen, die unter Anwendung von siRNA-Techniken ein Silencing der Fox m1-Expression erreichten und eine signifikante Reduktion in der Proliferation von Lungen-Tumorzellen bzw. Brustkrebszelllinien beobachteten. In Übereinstimmung damit beschrieben Krupczak-Hollis *et al.* 2003 für Fox m1-Knock out-Mäuse eine deutlich verlangsamte Leberregeneration nach 2/3 Hepatektomie.

Als ein Ergebnis der Microarray-Experimente und der dazu durchgeführten PCRs wurde eine Down-Regulation des Fox m1 zum Ende der Kultur (Tag 8) sowie eine deutlich geringere Expression in Hepatozyten während der G₀-Phase des Zellzyklus im Vergleich zu proliferierenden Ovalzellen *in vivo* gefunden. Unter der Annahme, dass diese Down-Regulation kausal für die verminderte Proliferation sein könnte, wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz untersucht, ob durch eine transgene Expression des Fox m1b die Expansion serumfrei kultivierter Rattenhepatozyten über das bisherige Ausmaß hinaus ermöglicht wird. Unter serumfreien Kulturbedingungen war eine Verdreifachung der Zellzahl zu erreichen. In den transfizierten Zellkulturen konnten nur sehr wenige GFP-exprimierende Hepatozyten beobachtet werden. Eine quantitative Auswertung dieses Experimentes durch Zellzählung (transfiziert vs. Kontrolle) war aufgrund der wenigen, sichtbar (GFP)

transfizierten Zellen nicht möglich. Daher wurde die Zellkultur mikroskopisch verfolgt und qualitativ bewertet. Es konnten keine Cluster GFP-exprimierender Hepatozyten beobachtet werden. Selten fanden sich unmittelbar benachbarte GFP-exprimierende Hepatozyten (vgl. Abbildung 37). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden allerdings am Tag 3 der Kultur (zwei Tage nach Transfektion) gemacht, zu einem Zeitpunkt, als die Proliferation in nicht-transfizierten Hepatozyten gerade erst begann. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zellen transfiziert wurden und nicht aus einer Zellteilung hervorgingen. Weitere 48 h später konnten kaum noch fluoreszierende Hepatozyten beobachtet werden. Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors führte nicht zu einer stärkeren Proliferation der transfizierten Hepatozyten. Es kann ausgeschlossen werden, dass das hier verwendete humane Fox m1b keine Wirkung in Rattenhepatozyten hatte, da Wang *et al.* 2001 eine Spezies-übergreifende Wirkung trotz bestehender Spezies-spezifischer Unterschiede in der DNA-Sequenz zeigen konnten. Bedingt durch den transienten Charakter der Transfektion könnte die Transgen-Expression in Bezug auf ihren zeitlichen Umfang unzureichend gewesen sein. Diese These bleibt durch Verwendung anderer, z.B. viraler Vektoren, welche eine stabile Transgen-Expression ermöglichen, zu überprüfen. Neben diesen zellulären Faktoren kommen als Ursache für den Proliferationsstopp *in vitro* außerdem verschiedene, bisher nicht identifizierte extrazelluläre Faktoren in Betracht.

4.1.2 Extrazelluläre Faktoren

4.1.2.1 Zytokine, Serum und andere Supplemente

Die mit der Zellkultur verbundene Abnahme der proliferativen Kapazität primärer Rattenhepatozyten konnte durch die Transplantation der Zellen in eine Empfängerleber wiederhergestellt werden. Welches sind also die Ursachen für die verminderte Proliferation primärer Hepatozyten in Kultur? Am wahrscheinlichsten erscheint eine nicht optimale Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien. Nach Protokollen mit humanen und Rattenhepatozyten gilt die Stimulation der Proliferation serumfrei kultivierter Hepatozyten in Gegenwart von EGF und HGF als Gold-Standard bei der Vermehrung der Zellen (Block *et al.* 1996, Michalopoulos *et al.* 1999). Es sind noch weitere Faktoren bekannt, die die Proliferation von Hepatozyten stimulieren sollen. Die in der Literatur beschriebenen Effekte von TNF α auf die Zellproliferation sind zum Teil widersprüchlich. Beyer *et al.* 1993, Haruyama *et al.* 2000 und Iocca *et al.* 2003 fanden in ihren Untersuchungen, dass TNF α *in vitro* als direktes Mitogen auf Rattenhepatozyten wirkt. Fausto 2000 und Webber *et al.* 1998 dagegen beschrieben, dass die Hepatozyten durch TNF α entsprechend konditioniert

wurden und erst dadurch auf die Wachstumsfaktoren HGF und EGF reagieren konnten. Jedoch wurden die Versuche immer in Kombination von TNF α mit entweder EGF oder HGF durchgeführt. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigten, dass TNF α in Kombination mit EGF und HGF keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Hepatozyten hatte (Abbildung 24). Offensichtlich wurde die maximal mögliche Proliferation durch die Kombination von EGF und HGF bereits erreicht.

In der Literatur wurden auch die Effekte von ATP auf die Proliferation von Zellen beschrieben. Die inhibierende oder stimulierende Wirkung von ATP auf die Proliferation wird von der Zellart, deren Differenzierungsgrad und anderen experimentellen Bedingungen bestimmt (Yamada *et al.* 2002, Arnaud *et al.* 2003a). Maaser *et al.* 2002 und Rapaport *et al.* 1983 beschrieben eine inhibierende Wirkung von ATP auf die Proliferation von Tumorzellen, dagegen fanden Thevananther *et al.* 2004 bei mit ATP γ S und EGF kultivierten Rattenhepatozyten eine Steigerung der Zellzahl um ca. 35% im Vergleich zur Kultur nur mit EGF. In den hier vorgestellten Experimenten bewirkte die Kombination von EGF und HGF mit ATP keine signifikant bessere Proliferation der Hepatozyten. Auch hier könnte die Stimulation durch EGF und HGF bereits so stark gewesen sein, dass der Zusatz von ATP die Proliferation nicht mehr weiter steigern konnte.

Zur Imitation physiologischer Bedingungen in der Zellkultur werden häufig vor allem fötale Seren eingesetzt, um die Zellen mit Wachstumsfaktoren und Hormonen zu versorgen. Die serumfreie Kultur der Zellen ist aber eine grundsätzliche Voraussetzung für eine spätere Anwendung der *in vitro*-expandierten Zellen am Menschen. Trotzdem wurde geprüft, ob die Proliferationsfähigkeit primärer Hepatozyten in der Kultur durch Serumzusatz verbessert werden konnte. Fötale Kälberserum enthält alle Faktoren, die für Wachstum und Entwicklung erforderlich sein könnten, während PHx-Serum diejenigen löslichen Faktoren enthalten sollte, die zur Leberregeneration *in vivo* benötigt werden. Aber weder durch Zusatz von 10% FKS noch 10% PHx-Serum konnte die Proliferation verbessert werden, im Gegenteil, die Zellzahl verringerte sich mit fortschreitender Kultur auf 50% der Ausgangszellzahl. Diese Beobachtung stimmt mit der Arbeit von Enat *et al.* 1984 überein, der eine cytotatische bis cytotoxische Wirkung von fötalem Serum auf Rattenhepatozyten beschrieb. In Versuchen mit Schweinehepatozyten konnte allerdings beobachtet werden, dass eine Kultur mit Williams E-Medium und 10% FKS selbst auf nicht Kollagen-beschichteten Platten eine vergleichbare Proliferation erlaubte, wie die Verwendung von HGM mit EGF und HGF (Daten nicht gezeigt). Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Spezies auf bestimmte Nährmedien unterschiedlich reagieren.

4.1.2.2 Zell-Zell-Kontakte

Ein weiterer Ansatz zur Imitation physiologischer Bedingungen für primäre Hepatozyten in Kultur ist die Co-Kultur mit Nichtparenchymzellen (NPC) der Leber, um Zell-Zell-Kontakte zu ermöglichen. Dazu wurden NPCs aus humaner Leber isoliert, expandiert und später primäre humane Hepatozyten auf diesen NPCs ausplattiert. Mit diesen Co-Kulturen ließ sich keine Stimulation der Proliferation humaner Hepatozyten erreichen (Abbildung 4). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Tateno *et al.* 2000 überein. Auch Ries *et al.* 2000 beschrieben, dass die Co-Kultur von Rattenhepatozyten mit Ratten-NPC zwar den Differenzierungsgrad der Hepatozyten länger aufrecht erhielt, die Proliferation der Hepatozyten aber nicht stimulierte. Bei Verwendung von NPC-konditioniertem Medium wurde dagegen die DNA-Synthese und Proliferation in Reinkulturen von Hepatozyten stimuliert. Im Gegensatz dazu berichteten Shimaoka *et al.* 1987, dass konditioniertes Medium von NPCs die Proliferation von Hepatozyten hemmte. Wegner *et al.* 1992 konnten in mit einer Rattenendothelzelllinie co-kultivierten Rattenhepatozyten ebenfalls keine verbesserte Proliferation beobachten, bei porcinen Hepatozyten dagegen schon. Die Effekte der Co-Kultur sind komplex und hängen nicht zuletzt auch vom verwendeten Nährmedium, dem Kultursystem sowie der Spezies der Zellen ab, was die teils kontroversen Berichte in der Literatur erklären dürfte.

Der Nachweis von Desmin- und α SMA-mRNA deutete darauf hin, dass die Hepatozytenkulturen auch Ito-Zellen enthielten. Daher wurden immunhistochemische Färbungen für Desmin und α SMA durchgeführt. Während am dritten Kulturtag nur vereinzelte Ito-Zellen nachgewiesen werden konnten, waren es am achten Tag schon deutlich mehr. In Hepatozytenkulturen überspannen Ito-Zellen häufig mehrere Hepatozyten und können dabei, je nach Kulturdauer, den Hepatozytenmonolayer nahezu vollständig bedecken (Ries *et al.* 2000). Dies könnte die verminderte Proliferation zum Ende des Kulturzeitraumes erklären, da in Co-Kulturen mehrfach cytostatische Effekte der NPCs auf Hepatozyten beschrieben wurden. Allerdings würde man dann auch erwarten, dass die in den Hepatozytenkulturen vorhandenen Nichtparenchymzellen eine phänotypische Stabilisierung der Hepatozyten (EROD-, PROD-Aktivität, Harnstoffsyntheserate) bewirken. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden.

4.1.2.3 Extrazelluläre Matrixproteine (ECM-Proteine)

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Arbeiten über den Einfluss von Substraten auf die Proliferation und den Erhalt zellspezifischer Funktionen kultivierter Hepatozyten. Üblicherweise werden zur Beschichtung der Kulturschalen Kollagene, Fibronectin, Laminin aber auch Matrigel[®],¹⁵ benutzt. Diese Substrate sollen dabei möglichst optimale physiologische Bedingungen für die darauf ausplattierten Zellen bereitstellen. Allerdings zeigten die einzelnen Substrate auch unterschiedliche Wirkungen auf die Zellen (Blaheta *et al.* 1998, Nagaki *et al.* 2000, Rudolph *et al.* 1999). Werden Hepatozyten auf Typ I Kollagen ausplattiert, so flachen sie schnell ab und verlieren ihre polygonale Form. Im Verlauf der Kultur gehen typische hepatozytäre Eigenschaften, wie z.B. Harnstoffsynthese oder CYP450-Aktivität verloren (Arterburn *et al.* 1995, Block *et al.* 1996, Lazaro *et al.* 2003). Werden Rattenhepatozyten dagegen auf Matrigel[®] ausplattiert, behalten sie ihre Kugelform, was als Indikator für einen differenzierten Zellstatus gilt (Nagaki *et al.* 2000). Otsu *et al.* 2001 konnten zeigen, dass auf Typ I Kollagen ausplattierte Rattenhepatozyten innerhalb von drei Tagen eine verminderte mRNA-Expression für hepatozytenspezifische Gene zeigen. Ein nachträgliches Übersichten der bereits dedifferenzierten Zellen mit Matrigel[®] hatte eine Rekonstitution der mRNA-Level zur Folge. Kim *et al.* 1998 beschrieben für acht Tage kultivierte Rattenhepatozyten, dass diese zwar proliferierten, aber gleichzeitig auch dedifferenzierten. Nach einem Matrigel[®]-Overlay kam es zu einem Proliferationsstopp bei gleichzeitiger Re-Expression von Differenzierungsmarkern (z.B. Albumin- und Transferrin-mRNA). Nagaki *et al.* 2000 untersuchten den Einfluss der extrazellulären Matrix näher und fanden, dass die mRNA-Expression Zellzyklus-regulierender Gene, wie z.B. Cyclin A oder Cyclin D1, durch Matrigel[®] down-reguliert, die mRNA-Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 (CDK = regulatorische Untereinheiten der Cycline) dagegen up-reguliert wurde.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Effekte der ECM wurde folgende Hypothese für den Proliferationsstopp zum Ende der Kultur entwickelt: Aufgrund der verstärkten Expression von ECM-Protein-Genen und gleichbleibender (z.B. MMP2) oder Down-Regulation (z.B. MMP13) von Matrixmetalloproteinasen bei gleichzeitiger Up-Regulation von Inhibitoren der MMPs (TIMPs) bildet sich ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau

¹⁵ Matrigel ist eine Präparation aus löslichen Bestandteilen der Basalmembran, welche von Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarkomazellen sezerniert werden. Hauptbestandteile sind Laminin, Typ 4 Kollagene, Proteoglykane, Entactin, Nidogen sowie eine Vielzahl von löslichen oder matrixassoziierten Zytokinen.

der ECM-Proteine aus. In der Folge kommt es zur Akkumulation von ECM-Proteinen auf den Zellen. Dies wiederum löst eine Signalkaskade aus, welche die Proliferation der Zellen zum Erliegen bringt. Allerdings konnten auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der kultivierten Hepatozyten keine fibrillären Strukturen, wie sie z.B. Kollagen Typ I und V bilden würden (Amenta *et al.* 1997), beobachtet werden (vgl. Abbildung 35). Zumindest für die frühe Phase der Zellkultur stehen diese Beobachtungen in Widerspruch zu dem von Stamatoglou *et al.* 1987 publizierten Nachweis von Fibronectin und Fibrin auf kultivierten Rattenhepatozyten. Auch bei Arterburn *et al.* 1995 finden sich Hinweise auf interzelluläre Fibrinfasern in Hepatozytenkulturen. Weiterhin kann die ausbleibende Rekonstitution hepatozytenspezifischer Eigenschaften (EROD- und PROD-Aktivität, Harnstoffsynthese) zum Ende des Kulturzeitraumes als zusätzliches Indiz dafür gewertet werden, dass keine ECM-Proteine auf den Hepatozyten abgelagert wurden. Eine solche ECM-Deposition sollte zumindest teilweise einem Overlay der Zellen mit Kollagen oder Matrigel[®] gleichen und dann auch eine zumindest partielle Rekonstitution hepatozytenspezifischer Marker und Eigenschaften hervorrufen können. Als mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen vorliegender Arbeit und Literaturdaten sei darauf verwiesen, dass der bloße Nachweis einer mRNA nicht zwangsläufig auch deren Translation und damit die Expression der Proteine nach sich zieht. Als Beispiel sei an dieser Stelle die Expression von CX32, PCK1 und CYP1A1 in kultivierten Rattenhepatozyten genannt. Trotz zunehmender mRNA-Expression mit fortschreitender Kultur konnte das jeweilige Protein im Western Blot nur am Anfang der Kultur nachgewiesen werden (Abbildung 30 und Abbildung 31). Es finden sich auch Berichte über intrazellulär lokalisiertes Kollagen und Laminin (Stamatoglou *et al.* 1987, Ikeda *et al.* 1994), die einer Visualisierung durch REM-Aufnahmen nicht zugänglich wären. Allerdings ist nicht anzunehmen, dass im untersuchten Kulturmodell ausschließlich intrazellulär lokalisierte ECM-Proteine synthetisiert wurden. Stamatoglou *et al.* 1987 berichteten weiterhin, dass unter serumfreien Bedingungen sehr viel weniger ECM synthetisiert und sezerniert wird, als bei Serumzusatz. Amenta *et al.* 1997 beschrieben, dass Hepatozyten eine lösliche Form des Fibronectins synthetisieren und an das Blut abgeben, während die unlösliche Form von epithelialen und anderen Zellen produziert wird. Hinweise zum Einfluss löslicher Bestandteile der ECM auf die Zellproliferation finden sich bei Blaheta *et al.* 1999. Es wäre also durchaus denkbar, dass lösliche Bestandteile an das Nährmedium abgegeben wurden und dann die Proliferation beeinflusst haben könnten. Allerdings wurde aller 48 h ein Medienwechsel durchgeführt, so dass es zu keiner nennenswerten Akkumulation löslicher ECM-Bestandteile gekommen sein sollte.

Obwohl *in vitro* auch für Hepatozyten die Expression von Kollagenen (Tseng *et al.* 1983, Diegelmann *et al.* 1983, Stamatoglou *et al.* 1987), Vitronektin (Otter *et al.* 1995), Laminin und Fibrinogen (Stamatoglou *et al.* 1987) sowie Fibronektin (Kim *et al.* 1998, Odenthal *et al.* 1992) beschrieben wurde, stellen *in vivo* die Ito-Zellen die Hauptquelle für ECM-Proteine dar (Arnaud *et al.* 2003b, Knittel *et al.* 1999, Vickers *et al.* 2004). Der Nachweis von Ito-Zellen in den Hepatozytenkulturen in Verbindung mit der in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht sichtbaren Deposition extrazellulärer Matrixproteine wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Dabei gilt es zu untersuchen, ob durch immunocytochemische Färbungen eine Akkumulation von ECM-Proteinen im Verlauf der serumfreien Zellkultur nachgewiesen werden kann. Wenn es Matrixproteine auf den Zellen gibt, dann könnte man durch Zusatz von Heparin oder anderen Antikoagulantien zum Nährmedium ggf. eine verminderte Matrixdeposition erreichen (Stamatoglou *et al.* 1987).

4.2 Funktionalität serumfrei kultivierter Hepatozyten

4.2.1 Hepatozytenspezifische Funktionen in Primärkulturen

Die Kultur primärer Zellen ist in der Regel mit dem Verlust zellspezifischer Funktionen verbunden (Arterburn *et al.* 1995, Block *et al.* 1996, Lazaro *et al.* 2003). Dies wurde in den vorliegenden Untersuchungen an serumfrei kultivierten Hepatozyten von Schwein und Ratte bestätigt. Rattenhepatozyten erhielten die Harnstoffsynthese sowie die EROD- und PROD-Aktivität während der Kultur zunächst noch einige Tage unvermindert aufrecht, bevor diese Funktionen auf basale Werte sanken. Bei porcinen Hepatozyten wurde teilweise ein rapider Abfall in den Enzymaktivitäten beobachtet. In humanen Zellen blieben sowohl Harnstoffsynthese als auch EROD- und PROD-Aktivität nahezu konstant.

In der Literatur finden sich diverse Arbeiten zur biochemischen Funktionalität kultivierter Hepatozyten. Aufgrund der verwendeten Nährmedien, der eingesetzten Zytokine und Hormone und der Unterschiede bei der Bestimmung und Angabe der Enzymaktivitäten können die biochemischen Parameter häufig nicht direkt miteinander verglichen werden. Zhou *et al.* 1998 und Joly *et al.* 1997 fanden ähnliche EROD-Aktivitäten für Schweinehepatozyten, während Gregory *et al.* 2000 deutlich höhere EROD-, aber gleiche PROD-Aktivitäten beschrieben. Donato *et al.* 1999 fanden am ersten Kulturtag die niedrigste EROD-Aktivität in porcinen Hepatozyten, die höchste in Rattenhepatozyten. In den eigenen Versuchen zeigten dagegen die Schweinehepatozyten die höchste EROD-Aktivität am ersten Kulturtag. Die gemessene Harnstoffsyntheserate in Rattenhepatozyten war deutlich höher als in porcinen oder humanen Zellen, was im Gegensatz zur Arbeit von Vilei *et al.* 2001 steht.

In Übereinstimmung mit den bereits zitierten Publikationen lässt sich zusammenfassen, dass im Verlauf der Monolayer-Zellkultur in aller Regel ein Verlust an leberzellspezifischen Syntheseleistungen und Enzymaktivitäten eintritt, je nach Kultursystem und Nährmedienkomposition gibt es dabei quantitative Unterschiede. Die Ursachen dafür sind vielschichtig. So weisen proliferierende Zellen nur noch einen minimalen Differenzierungsgrad auf (Strehl *et al.* 2002). Damit erklärt sich der Verlust zellspezifischer, biochemischer Funktionen während der Proliferationsphase von Ratten- und Schweinehepatozyten sowie die Aufrechterhaltung dieser Funktionen in den nicht proliferierenden humanen Hepatozyten. Nach erfolgter Proliferation wird jedoch der zuvor vorhandene Differenzierungsgrad der Hepatozyten offensichtlich nicht wiedererlangt. Dies könnte ebenso die Folge der kulturbedingten Dedifferenzierung der Zellen wie auch einer funktionellen Down-Regulation¹⁶ sein. In den Induktionsversuchen konnte gezeigt werden, dass sich unter Zusatz von CPT-cAMP zum Medium die Harnstoffsyntheserate bei Ratten- und Schweinehepatozyten aufrechterhalten lässt, der Zusatz von β -Naphthoflavon induzierte die Enzymaktivität von CYP1A1 teilweise deutlich über Werte von frisch kultivierten Zellen.

In humanen Hepatozyten allerdings konnte eine signifikante Induktion der Harnstoffsynthese durch CPT-cAMP nur schwerlich nachgewiesen werden, während β -Naphthoflavon die EROD-Aktivität signifikant induzierte. Dies stimmt mit der Arbeit von Runge *et al.* 2000 überein, die in acht Tage kultivierten humanen Hepatozyten die Induktion der EROD-Aktivität durch 48-stündige Einwirkung von β -Naphthoflavon zeigen konnten. Quantitative, aber auch qualitative Unterschiede treten möglicherweise allein schon dadurch auf, dass humane Hepatozyten von verschiedenen Individuen große Schwankungen in den Enzymaktivitäten zeigen (Gebhardt *et al.* 2003). Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Enzymaktivitäten bedingt durch Vorerkrankungen und/oder Medikation der Zellspender bereits beeinflusst worden waren und sich somit in der Stimulierbarkeit in den einzelnen Experimenten deutliche Unterschiede ergaben.

In vitro expandierte Hepatozyten aus Ratte und Schwein haben während der Zellkultur einen Teil ihrer zellspezifischen Funktionen verloren. Die Induktion wesentlicher hepatozytenspezifischer Funktionen *in vitro* deutet auf eine funktionelle Down-Regulation während der Zellkultur hin. In Transplantationsversuchen konnte für Rattenhepatozyten

¹⁶ Unter einer funktionellen Down-Regulation ist der transiente Verlust spezifischer Eigenschaften aufgrund fehlender, die Funktion erhaltender endokriner Substanzen sowie Nährsubstrate und Metabolite zu verstehen. Werden diese Substanzen, Nährsubstrate, Metaboliten supplementiert, werden auch die Funktionen entsprechend rekonstituiert.

gezeigt werden, dass dieser Funktionsverlust unter adäquaten Bedingungen reversibel war. Diese Interpretation wird auch durch den Befund unterstützt, dass zwar spezifische hepatozytäre Proteine, wie z.B. PCK1, CYP1A1 und CX32 nach wenigen Tagen in Kultur nicht mehr nachweisbar waren, die mRNA-Menge über die Zeit jedoch zunahm (Abbildung 30 und Abbildung 31). Man kann also schließen, dass der teilweise Funktionsverlust der Zellen mit zunehmender Kulturzeit nicht auf eine generelle Dedifferenzierung der Zellen zurückzuführen war.

4.2.2 Hepatozytenspezifische Funktionen in passagierten Hepatozyten

In der regenerativen Medizin werden bereits heute autologe Zelltransplantationen zur Behandlung von Haut- und Knorpeldefekten eingesetzt (Darling *et al.* 2005, Johnsen *et al.* 2005). Die Verwendung körpereigener Zellen vermeidet akute Abstoßungsreaktionen, allerdings steht in den seltensten Fällen ausreichend autologes Zellmaterial zur Verfügung, so dass eine *in vitro*-Expansion der Zellen erforderlich wird. Wie unter 4.1.1 ausgeführt, besteht dabei jedoch grundsätzlich die Gefahr, dass die vermehrten Zellen einer replikativen Seneszenz unterliegen. So konnten Parsch *et al.* 2002 beispielsweise zeigen, dass sich in humanen Knorpelzellen während einer etwa 8-10-fachen *in vitro*-Expansion (ca. drei Populationsverdopplungen) die Telomere im selben Maße verkürzten, wie während einer 30-jährigen Alterung *in vivo*. Darling *et al.* 2005, Nur Adelina *et al.* 2004 und Velikonja *et al.* 2001 fanden in mehrfach passagierten Knorpelzellkulturen signifikante Änderungen im Phänotyp (verminderte Sekretion von Kollagen Typ II und Aggrecan, vermehrte Synthese von Kollagen Typ I), die auf eine Dedifferenzierung der *in vitro* expandierten Zellen hinwies. Propagierete, aber dadurch seneszente und dedifferenzierte Zellen könnten demnach für eine weitere Anwendung zur Transplantation ungeeignet sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Passagierung von Schweinehepatozyten deuten darauf hin, dass der hepatozytäre Charakter der Zellen und deren biochemische Funktionalität zumindest teilweise erhalten bleibt. Sowohl die Harnstoffsyntheserate als auch die EROD- und PROD-Aktivität fielen bereits in der Primärkultur stark ab. Dieser starke Funktionsverlust korrelierte zeitlich mit der Proliferation der Zellen. Mit fortschreitender Passagierung ließ die Proliferation der Hepatozyten nach und es kam zur partiellen Rekonstitution von EROD-/ PROD-Aktivität und Harnstoffsyntheserate in den Zellen der 4. Passage (Abbildung 17-Abbildung 19).

4.2.3 Hepatozytenspezifische Funktionen transplantiertter Hepatozyten nach *in vitro*-Expansion

Der funktionelle Leberersatz durch Hepatozytentransplantation kann nur dann erfolgreich sein, wenn sich einerseits die transplantierten Zellen im Empfängerorgan integrieren und dieses durch Proliferation repopulieren (Ersatz des Empfängerlebergewebes durch transplantierte Hepatozyten). Andererseits muss die Funktionalität der transplantierten Hepatozyten gewährleistet sein. Das heißt, frisch isolierte Hepatozyten müssen ihre Funktionalität behalten bzw. kryokonservierte oder *in vitro*-expandierte Hepatozyten ihre Funktionalität wiedergewinnen, wenn diese zuvor durch Lagerung oder Kultur verloren gegangen ist. Die Funktionalität und Repopulationskapazität frisch isolierter Hepatozyten wurde durch Transplantation syngener und xenogener Hepatozyten in verschiedenen Tiermodellen bereits untersucht. Laconi *et al.* 1998 konnten in CD26-defizienten Ratten zeigen, dass nach Transplantation von Wildtyp-Hepatozyten diese die Empfängerleber weitgehend repopulierten und dass sich zwischen transplantierten und Wirtshepatozyten Hybrid-Gallengangskanälchen bildeten. Dies lässt auf die funktionelle Integration der Zellen im Empfängergewebe schließen. Dandri *et al.* 2001 transplantierten frisch isolierte humane Hepatozyten in Mäuse und konnten zeigen, dass diese Zellen sowohl proliferierten als auch humanes Albumin produzierten. Wurden die Hepatozyten zuvor kultiviert, konnten sie jedoch keine erfolgreiche Integration der Zellen beobachten. Obwohl die Kryokonservierung von Hepatozyten mit einem partiellen Verlust an Vitalität und zellspezifischen Funktionen verbunden sein kann (Katenz *et al.* 2007, Ostrowska *et al.* 2000, Sauer *et al.* 2003, van de Kerkhove *et al.* 2004), konnten Cho *et al.* 2004 bei der Transplantation kryokonservierter humaner Hepatozyten in Mäuse zeigen, dass sich die Expression hepatozytenspezifischer Gene in transplantierten und Wirtshepatozyten nicht unterschied. Dies ließ wiederum auf die funktionelle Gleichwertigkeit der transplantierten Zellen mit den Wirtshepatozyten in der Mausleber schließen. Auch beim Menschen wurden kryokonservierte humane Hepatozyten zur Transplantation eingesetzt (Fox *et al.* 2004, Ohashi *et al.* 2001, Sokal *et al.* 2003, Stephenne *et al.* 2005).

In der Literatur findet sich lediglich die Arbeit von Strom *et al.* 1997b, worin die Transplantation zuvor für 48 h kultivierter, humaner Hepatozyten zur Zelltransplantation beschrieben wurde. Rattenhepatozyten, die vier oder sieben Tage kultiviert worden waren, haben ihre Proliferationsfähigkeit und hepatozytären Eigenschaften teilweise verloren. Trotzdem waren diese Zellen in der Lage, nach Transplantation die Empfängerleber zu repopulieren. Auch exprimierten sie hepatozytenspezifische Proteine wie CX32 und PCK1

(Aurich *et al.* 2005). Dies zeigt, dass unter den physiologischen Bedingungen in der Empfängerleber die in Kultur verloren gegangenen Eigenschaften rekonstituiert wurden. Damit besteht prinzipiell die Möglichkeit, Hepatozyten vor der Transplantation ohne signifikante funktionelle Schädigung *in vitro* zu expandieren. Ob dies auch für humane Hepatozyten gilt, bleibt zu untersuchen. Zwar war der funktionelle Verlust im Vergleich zu den kultivierten Hepatozyten anderer Spezies eher gering, jedoch kann die fehlende Proliferationsfähigkeit (prä)seneszenter humaner Hepatozyten ein Problem für die erfolgreiche Hepatozytentransplantation darstellen. Abhilfe könnten Hepatozyten von jüngeren Spendern schaffen, diese stehen jedoch praktisch nicht zur Verfügung.

4.3 Klinische Implikationen

In tierexperimentellen Studien zur Transplantation syngener und allogener Hepatozyten konnte die erfolgreiche Repopulation der Empfängerleber durch die transplantierten Hepatozyten sowie deren biochemische Funktionalität gezeigt werden (Laconi *et al.* 1998, Overturf *et al.* 1997, Weglarz *et al.* 2000). Eine Voraussetzung für die Leberrepopulation war dabei eine Vorbehandlung der Empfängerleber, die sicherstellte, dass die Proliferation der endogenen Hepatozyten gehemmt wird. Im Tiermodell wurde dazu häufig eine Vorbehandlung durch Retrorsin-Intoxikation oder Bestrahlung genutzt. In Kombination mit einem Proliferationsstimulus, z.B. durch partielle Hepatektomie, erhalten die transplantierten Hepatozyten so einen Wachstumsvorteil. Aus klinischer Sicht kann aber weder eine Intoxikation noch partielle Hepatektomie am Patienten angewandt werden, um die Leber für eine Repopulation durch transplantierte Hepatozyten vorzubereiten (Weber *et al.* 2006). In wenigen Ausnahmefällen (z.B. bei einer Paracetamol-Vergiftung) kann ggf. auch auf eine Prä-Konditionierung der Empfängerleber verzichtet werden, da als Folge der Vergiftung bereits ein Proliferationsstimulus erzeugt wurde.

Die Erfolge der Hepatozytentransplantation beim Menschen sind bis heute immer noch unbefriedigend und bleiben deutlich hinter den Erwartungen, welche die tierexperimentellen Studien geweckt haben, zurück. Maßgeblich trägt dazu sicherlich die unzureichende Qualität der transplantierten Hepatozyten bei, welche aus nicht zur Organtransplantation freigegeben Lebern gewonnen werden (Fox *et al.* 2004, Ohashi *et al.* 2001). Zur Sicherstellung der permanenten Verfügbarkeit von transplantierbaren Hepatozyten werden diese nach der Isolierung in der Regel kryokonserviert, was mit einem zusätzlichen Verlust an Vitalität und Funktionalität verbunden ist (Katenz *et al.* 2007, Ostrowska *et al.* 2000, Sauer *et al.* 2003). Im

Tierexperiment konnten Cho *et al.* 2004 und Jamal *et al.* 2000 jedoch zeigen, dass auch kryokonservierte Hepatozyten erfolgreich transplantiert werden können.

Es werden verstärkt neue Ressourcen gesucht, um funktionelle Hepatozyten zu generieren. Neben einer hepatozytären Differenzierung von Stammzellen richtet sich das Interesse auch auf xenogene Hepatozyten. Porcine Hepatozyten werden heute bereits in verschiedenen Leber-Support-Systemen eingesetzt. Es gelingt dadurch, bei Patienten mit akutem Leberversagen die Zeit bis zur Verfügbarkeit eines Spenderorgans zu überbrücken (Coffman *et al.* 1996, Sauer *et al.* 2003, Watanabe *et al.* 1997). Vielfältige Bemühungen sind unternommen worden, um transgene „humanisierte“ Schweine zu generieren und damit die Gefahr akuter Abstoßungsreaktionen bei Organ- oder Zelltransplantationen zu verringern (Luo *et al.* 2002). Die Gefahr von Xenozoonosen, z.B. durch Infektion mit dem porcinen endogenen Retrovirus (PERV), wird rege diskutiert. Bisher sind aber keine Übertragungen und Erkrankungen beobachtet worden (Di Nicuolo *et al.* 2005, Levy *et al.* 2000, Paradis *et al.* 1999). Auch wenn Hepatozyten vom Schwein in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen würden, ist es im Sinne des geforderten Tierschutzes der EU Richtlinie zum Umgang mit Versuchstieren (EU Directive 86/609/EEC) erforderlich, die Hepatozyten *in vitro* für klinische und/oder toxikologisch-pharmakologische Anwendungen zu expandieren. Die hier vorgestellten Untersuchungen mit Schweinehepatozyten haben erstmals gezeigt, dass die Expansion der Zellen unter dem, für therapeutische Anwendungen notwendigen Erhalt hepatozytenspezifischer Funktionen möglich ist. Aus den Ergebnissen zur Transplantation *in vitro*-expandierter Rattenhepatozyten kann extrapoliert werden, dass die Zellen nach Transplantation in eine Empfängerleber zur funktionellen Rekonstitution des Empfängerlebergewebes in der Lage sind. Dies kann unter Anwendung einer entsprechenden Prä-Konditionierung der Empfängerleber auch für die Hepatozytentransplantation beim Menschen angenommen werden. Derzeit können humane Hepatozyten unter serumfreien Bedingungen jedoch nicht zuverlässig expandiert werden. Die Ursachen sind vielfältig und sehr wahrscheinlich auch im Alter der Zellspender zu suchen. Es sind hier zum einen die Auswirkungen einer altersbedingt zunehmenden Polyploidie. Andererseits konnten Wege *et al.* 2003 zeigen, dass fötale Hepatozyten *in vitro* nach ca. 30-35 Populationsverdopplungen ihre Proliferation aufgrund kritisch verkürzter Telomere einstellten. Eine Rekonstitution der Telomeraseaktivität durch Transgen-Expression führte zu einer Elongation der Telomere. Als Folge kam es zu einer Immortalisierung der Hepatozyten und einer erneuten Proliferation *in vitro*.

Wenn die Ursachen für die eingeschränkte Expandierbarkeit von Hepatozyten *in vitro* tatsächlich in der Expression proliferationsinhibierender oder –fördernder Gene begründet lägen, wären prinzipiell zwei gentherapeutische Strategien denkbar: Einerseits könnte die Expression von „Proliferationsinhibitoren“ durch Gene Silencing (z.B. durch RNA-Interference) unterdrückt werden. Andererseits könnten proliferationsfördernde, aber down-regulierte Gene durch Transgen-Expression überexprimiert werden. Zum Erreichen hoher Effizienzen bei der Einschleusung des Transgens können virale Vektoren eingesetzt werden. Dabei ist es jedoch unabdingbar, die Transgen-Expression *in vitro* und *in vivo* steuern zu können. Derzeit stehen allerdings keine zugelassenen Verfahren für eine sichere Anwendung der Gentherapie am Menschen zur Verfügung. Otsu *et al.* 2002 berichteten über erste Anwendungen der Gentherapie beim Menschen. Etwa 18 Monate später wurde die Ausbildung von Leukämien bei einem Teil der behandelten Patienten beobachtet (Gänsbacher 2003a, Gänsbacher 2003b). Im Tierexperiment konnte jetzt gezeigt werden, dass die Ausbildung der Leukämie dabei unabhängig von der Integrationsstelle des Transgens im Genom der Wirtszelle erfolgte, sondern eher auf die Wechselwirkung des Transgen-Produktes mit Onkogenen zurückzuführen ist (Woods *et al.* 2006). Eine weitere gentherapeutische Anwendung beim Menschen wurde jüngst von Ott *et al.* 2006 publiziert. Hier kam es in der Folge zu einem Todesfall, wobei ein direkter Zusammenhang mit der Gentherapie bisher nicht zweifelsfrei widerlegt werden konnte (Siegmond-Schultze 2006).

Das Ziel zukünftiger Forschungen auf dem Gebiet der Hepatozytentransplantation könnte die Entwicklung klinisch anwendbarer Prä-Konditionierungsverfahren sein, um die verfügbaren Hepatozyten effektiv transplantieren und eine maximale Repopulation der Empfängerleber erreichen zu können. Alexandre *et al.* 2002, Müller *et al.* 2004 und Terry *et al.* 2005 konnten mit einer Prä-Inkubation vor Kryokonservierung eine Verbesserung der Viabilität und Funktionalität kryokonservierter Hepatozyten zeigen. Es könnte daher auch sinnvoll sein, Hepatozyten unmittelbar vor einer Transplantation in ähnlicher Weise vorzubehandeln. Diese „Re-Vitalisierung“ der Zellen könnte ggf. die Transplantationseffizienz erhöhen. Bis zur Verfügbarkeit von Zellkulturverfahren, die eine zuverlässige Expansion humaner Hepatozyten *in vitro* erlauben, müssen auch weiterhin alternative Quellen (z.B. adulte Stammzellen) zur Gewinnung bzw. Generierung funktionaler Hepatozyten nutzbar gemacht werden. Aber auch bei Verwendung von *in vitro*-differenzierten Stammzellen besteht die Gefahr, dass es aufgrund phänotypischer Instabilität der Zellen nach Transplantation zu unkontrollierten Wucherungen kommt (Roy *et al.* 2006).

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung der serumfreien Propagation von Hepatozyten *in vitro* unter Erhalt der spezifischen hepatozytären Funktionen. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit humaner Hepatozyten wurden die Untersuchungen hinsichtlich Proliferationskapazität und Funktionalität zunächst an Hepatozyten von Ratte und Schwein durchgeführt und dann mit den experimentellen Daten von humanen Hepatozyten verglichen. Weiterführende Untersuchungen erfolgten an Rattenhepatozyten.

Alle Hepatozyten wurden unter serumfreien Bedingungen und unter Zusatz von Wachstumsfaktoren (EGF und HGF) kultiviert. Als Parameter zur Beschreibung der Proliferation dienten der BrdU-Einbau, der ATP- und DNA-Gehalt sowie die Zellzahl. Zur Beschreibung des hepatozytenspezifischen Charakters der kultivierten Zellen wurde die EROD- und PROD-Aktivität sowie die Harnstoffsyntheserate bestimmt. Durch Zusatz von β -Naphthoflavon bzw. CPT-cAMP zum Kulturmedium wurde eine Induzierbarkeit von EROD-Aktivität bzw. Harnstoffsynthese in den kultivierten Hepatozyten geprüft.

Humane Hepatozyten konnten *in vitro* nicht vermehrt werden. Während der serumfreien Kultur wurde ein Anstieg des zellulären DNA-Gehalts beobachtet, was auf einen zunehmenden Ploidiegrad der Zellen schließen lässt. Gleichzeitig blieben hepatozytenspezifische Eigenschaften über den Kulturzeitraum nahezu konstant und nur mäßig induzierbar.

Schweinehepatozyten konnten unter serumfreien Kulturbedingungen sehr gut vermehrt werden. In der Primärkultur konnte die Ausgangszellzahl verfünffacht werden. Auch hier konnte mit dem Kulturverlauf eine deutliche Abnahme der hepatozytenspezifischen Eigenschaften beobachtet werden. Der Zusatz der Induktoren führte zu erhöhten hepatozytenspezifischen Stoffwechsel- und Syntheseleistungen. Erstmals wurden Subkulturen primärer Schweinehepatozyten etabliert und hinsichtlich ihrer proliferativen Kapazität und funktionellen Eigenschaften unter serumfreien Kulturbedingungen untersucht. Die porcinen Hepatozyten konnten viermal gesplittet werden. Dann proliferierten sie *in vitro* nicht mehr. Das entsprach einer 12-fachen Steigerung der Ausgangszellzahl. Die subkultivierten Zellen zeigten mit zunehmender Passage eine Zunahme des zellulären ATP- und DNA-Gehalts. Für einige hepatozytenspezifische Eigenschaften konnte in späten Zellpassagen eine teilweise Rekonstitution beobachtet werden. Grundsätzlich war in allen Zellpassagen eine Induzierbarkeit von EROD-Aktivität und Harnstoffsynthese gegeben. Insbesondere in späten Passagen lagen die induzierten Stoffwechsel- und Syntheseleistungen deutlich über denen primärer Zellen.

Rattenhepatozyten konnten unter serumfreien Kulturbedingungen ebenfalls expandiert werden, während 8-tägiger Kultur verdreifachte sich die Ausgangszellzahl. Wie schon bei porcinen Hepatozyten beobachtet, kam es im Verlauf der Zellkultur zu einem Verlust an hepatozytenspezifischen Eigenschaften, die jedoch unter Verwendung der entsprechenden Substanzen induziert werden konnten. Weiterhin konnte in Transplantationsversuchen erstmals gezeigt werden, dass in Kultur verloren gegangene zelluläre Marker *in vivo* rekonstituiert wurden. Aus den Ergebnissen der Induktions- und Transplantationsversuche kann gefolgert werden, dass der transiente Verlust hepatozytenspezifischer Marker und Funktionen auf eine funktionelle Down-Regulation aufgrund der Kulturbedingungen zurückzuführen und unter adäquaten Bedingungen reversibel ist. Damit wurde gezeigt, dass Hepatozyten vor ihrer Verwendung zur Transplantation *in vitro* expandiert werden können, wenn auch mit gewissen Einschränkungen. Deshalb wurden mit dem Ziel der Identifizierung molekularer Targets, welche für die Verminderung der Proliferation zum Ende des Kulturzeitraumes verantwortlich sein könnten, Microarray-Analysen durchgeführt. Der für die Zellproliferation wichtige Transkriptionsfaktor Fox m1 (Homolog zum humanen Fox m1b) wurde dabei als deutlich down-reguliert identifiziert. Die transgene Expression von Fox m1b führte allerdings nicht zur verbesserten Proliferation der Hepatozyten, was möglicherweise auf die geringe Transfektionseffizienz und am transienten Charakter der verwendeten Transfektionsmethode lag. Weiterhin wurde eine Up-Regulation verschiedener Gene der extrazellulären Matrix sowie der TIMPs beobachtet. Die Vermutung einer Zellzyklus-Arretierung, ausgelöst durch die Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine auf den Hepatozyten konnte in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zunächst nicht bestätigt werden. Stattdessen wurden in den Hepatozytenkulturen besonders zum Ende des Kulturzeitraumes Nichtparenchymzellen nachgewiesen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise genau diese NPCs durch Zell-Zell-Kontakte eine Hemmung der Proliferation der Rattenhepatozyten verursacht haben könnten. Inwiefern auch die Kulturen porciner und vor allem humaner Hepatozyten von kontaminierenden NPCs betroffen waren, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Literatur

- Aikata, H., H. Takaishi, Y. Kawakami, S. Takahashi, M. Kitamoto, T. Nakanishi, Y. Nakamura, F. Shimamoto, G. Kajiyama and T. Ide (2000)
Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation.
Exp Cell Res **256**(2): 578-82
- Akerman, P., P. Cote, S. Q. Yang, C. McClain, S. Nelson, G. J. Bagby and A. M. Diehl (1992)
Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy.
Am J Physiol **263**(4 Pt 1): G579-85
- Alexandre, E., C. Viollon-Abadie, P. David, A. Gandillet, P. Coassolo, B. Heyd, G. Manton, P. Wolf, P. Bachellier, D. Jaeck and L. Richert (2002)
Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies.
Cryobiology **44**(2): 103-13
- Alizadeh, A., M. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, H. Sabet, T. Tran, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, D. T. Moore, J. R. Hudson, Jr., W. C. Chan, T. Greiner, D. Weisenburger, J. O. Armitage, I. Lossos, R. Levy, D. Botstein, P. O. Brown and L. M. Staudt (1999)
The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol **64**: 71-8
- Ambrosino, G., S. Varotto, S. C. Strom, G. Guariso, E. Franchin, D. Miotto, L. Caenazzo, S. Basso, P. Carraro, M. L. Valente, D. D'Amico, L. Zancan and L. D'Antiga (2005)
Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1.
Cell Transplant **14**(2-3): 151-7
- Amenta, P. S. and D. Harrison (1997)
Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: a review.
Microsc Res Tech **39**(4): 372-86
- Anantharaju, A., A. Feller and A. Chedid (2002)
Aging Liver. A review.
Gerontology **48**(6): 343-53
- Arias, I. M., J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jakoby, D. A. Schachter and D. A. Shafritz (1994)
The liver: biology and pathobiology, Raven Press, Ltd., New York.
- Arnaud, A., L. Fontana, A. J. Angulo, A. Gil and J. M. Lopez-Pedrosa (2003a)
Exogenous nucleosides alter the intracellular nucleotide pool in hepatic cell cultures. Implications in cell proliferation and function.
Clin Nutr **22**(4): 391-9
- Arnaud, A., L. Fontana, A. J. Angulo, A. Gil and J. M. Lopez-Pedrosa (2003b)
Proliferation, functionality, and extracellular matrix production of hepatocytes and a liver stellate cell line: a comparison between single cultures and cocultures.
Dig Dis Sci **48**(7): 1406-13
- Arndt-Jovin, D. J. and T. M. Jovin (1977)
Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content.
J Histochem Cytochem **25**(7): 585-9
- Arterburn, L. M., J. Zurlo, J. D. Yager, R. M. Overton and A. H. Heifetz (1995)
A morphological study of differentiated hepatocytes in vitro.
Hepatology. **22**: 175-87.

- Aurich, H., S. Koenig, C. Schneider, J. Walldorf, P. Krause, W. E. Fleig and B. Christ (2005)
Functional characterization of serum-free cultured rat hepatocytes for downstream transplantation applications.
Cell Transplant **14**(7): 497-506
- Baker, T. K., M. A. Carfagna, H. Gao, E. R. Dow, Q. Li, G. H. Searfoss and T. P. Ryan (2001)
Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes.
Chem Res Toxicol **14**(9): 1218-31
- Beyer, H. S. and A. Theologides (1993)
Tumor necrosis factor-alpha is a direct hepatocyte mitogen in the rat.
Biochem Mol Biol Int **29**(1): 1-4
- Bismuth, H., D. Samuel, D. Castaing, R. Adam, F. Saliba, M. Johann, D. Azoulay, B. Ducot and L. Chiche (1995)
Orthotopic liver transplantation in fulminant and subfulminant hepatitis. The Paul Brousse experience.
Ann Surg **222**(2): 109-19
- Blaheta, R. A., B. Kronenberger, D. Woitaschek, M. K. Auth, M. Scholz, S. Weber, H. Schuldes, A. Encke and B. H. Markus (1998)
Dedifferentiation of human hepatocytes by extracellular matrix proteins in vitro: quantitative and qualitative investigation of cytokeratin 7, 8, 18, 19 and vimentin filaments.
J Hepatol **28**(4): 677-90
- Blaheta, R. A., B. Kronenberger, D. Woitaschek, C. Schick, E. Oppermann, M. K. Auth, A. J. Strain, S. Weber, A. Encke and B. H. Markus (1999)
Interference of soluble mediators into liver matrix triggered dedifferentiation of human hepatocytes.
Transplant Proc **31**(1-2): 502-4
- Block, G. D., J. Locker, W. C. Bowen, B. E. Petersen, S. Katyal, S. C. Strom, T. Riley, T. A. Howard and G. K. Michalopoulos (1996)
Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium.
J Cell Biol **132**(6): 1133-49
- Boess, F., M. Kamber, S. Romer, R. Gasser, D. Muller, S. Albertini and L. Suter (2003)
Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems.
Toxicol Sci **73**(2): 386-402
- Burgess, J. K. (2001)
Gene expression studies using microarrays.
Clin Exp Pharmacol Physiol **28**(4): 321-8
- Cho, J. J., B. Joseph, B. S. Sappal, R. K. Giri, R. Wang, J. W. Ludlow, M. E. Furth, R. Susick and S. Gupta (2004)
Analysis of the functional integrity of cryopreserved human liver cells including xenografting in immunodeficient mice to address suitability for clinical applications.
Liver Int **24**(4): 361-70
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem **162**(1): 156-9

- Coffman, K. L., A. Hoffman, P. Rosenthal, A. Demetriou and L. Makowka (1996)
Neurological and psychological sequelae in transplant recipients after bridging with the bioartificial liver.
Gen Hosp Psychiatry **18**(6 Suppl): 20S-24S
- Costa, R. H. (2005)
FoxM1 dances with mitosis.
Nat Cell Biol **7**(2): 108-10
- Costa, R. H., V. V. Kalinichenko, A. X. Holterman and X. Wang (2003)
Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration.
Hepatology **38**(6): 1331-47
- Dandri, M., M. R. Burda, E. Torok, J. M. Pollok, A. Iwanska, G. Sommer, X. Rogiers, C. E. Rogler, S. Gupta, H. Will, H. Greten and J. Petersen (2001)
Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus.
Hepatology **33**(4): 981-8
- Darling, E. M. and K. A. Athanasiou (2005)
Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations.
J Orthop Res **23**(2): 425-32
- Dhawan, A., R. R. Mitry and R. D. Hughes (2006)
Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders.
J Inherit Metab Dis **29**(2-3): 431-5
- Di Nicuolo, G., M. P. Kerkhove, R. Hoekstra, M. G. Beld, P. Amoroso, S. Battisti, M. Starace, E. Florio, V. Scuderi, S. Scala, A. Bracco, A. Mancini, R. A. Chamuleau and F. Calise (2005)
No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver.
Xenotransplantation **12**(4): 286-92
- Diegelmann, R. F., P. S. Guzelian, R. Gay and S. Gay (1983)
Collagen formation by the hepatocyte in primary monolayer culture and in vivo.
Science **219**(4590): 1343-5
- Dobrowolski, S. F., R. A. Banas, E. W. Naylor, T. Powdrill and D. Thakkar (1999)
DNA microarray technology for neonatal screening.
Acta Paediatr Suppl **88**(432): 61-4
- Donato, M. T., J. V. Castell and M. J. Gomez-Lechon (1999)
Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models.
J Hepatol **31**: 542-9.
- Enat, R., D. M. Jefferson, N. Ruiz-Opazo, Z. Gatmaitan, L. A. Leinwand and L. M. Reid (1984)
Hepatocyte proliferation in vitro: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix.
Proc Natl Acad Sci U S A **81**(5): 1411-5
- Fausto, N. (2000)
Liver regeneration.
J Hepatol **32**(1 Suppl): 19-31

- Fisher, R. A., D. Bu, M. Thompson, J. Tisnado, U. Prasad, R. Sterling, M. Posner and S. Strom (2000)
Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion.
Transplantation **69**(2): 303-7
- Fox, I. J., J. R. Chowdhury, S. S. Kaufman, T. C. Goertzen, N. R. Chowdhury, P. I. Warkentin, K. Dorko, B. V. Sauter and S. C. Strom (1998)
Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation.
N Engl J Med **338**(20): 1422-6
- Fox, I. J. and J. Roy-Chowdhury (2004)
Hepatocyte transplantation.
J Hepatol **40**(6): 878-86
- Gänsbacher, B. (2003a)
French gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position statement from the European Society of Gene Therapy.
J Gene Med **5**(1): 82-4
- Gänsbacher, B. (2003b)
Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT).
J Gene Med **5**(3): 261-2
- Gebhardt, R., J. G. Hengstler, D. Muller, R. Glockner, P. Buening, B. Laube, E. Schmelzer, M. Ullrich, D. Utesch, N. Hewitt, M. Ringel, B. R. Hiltz, A. Bader, A. Langsch, T. Koese, H. J. Burger, J. Maas and F. Oesch (2003)
New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures.
Drug Metab Rev **35**(2-3): 145-213
- Gerlach, J. C., K. Zeilinger, I. M. Sauer, T. Mieder, G. Naumann, A. Grunwald, G. Pless, G. Holland, A. Mas, J. Vienken and P. Neuhaus (2002)
Extracorporeal liver support: porcine or human cell based systems?
Int J Artif Organs **25**(10): 1013-8
- Gorla, G. R., H. Malhi and S. Gupta (2001)
Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells.
J Cell Sci **114**(Pt 16): 2943-51
- Gregory, P. G., C. K. Connolly, M. Toner and S. J. Sullivan (2000)
In vitro characterization of porcine hepatocyte function.
Cell Transplant. **9**: 1-10.
- Grossman, M., D. J. Rader, D. W. Muller, D. M. Kolansky, K. Kozarsky, B. J. Clark, 3rd, E. A. Stein, P. J. Lupien, H. B. Brewer, Jr., S. E. Raper and et al. (1995)
A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia.
Nat Med **1**(11): 1148-54
- Guha, C., B. Parashar, N. J. Deb, A. Sharma, G. R. Gorla, A. Alfieri, N. Roy-Chowdhury, J. Roy-Chowdhury and B. Vikram (2001)
Liver irradiation: a potential preparative regimen for hepatocyte transplantation.
Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(2): 451-7

- Gupta, S. (2000)
Hepatic polyploidy and liver growth control.
Semin Cancer Biol **10**(3): 161-71
- Gupta, S., E. Aragona, R. P. Vemuru, K. K. Bhargava, R. D. Burk and J. R. Chowdhury (1991)
Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation.
Hepatology **14**(1): 144-9
- Habibullah, C. M., I. H. Syed, A. Qamar and Z. Taher-Uz (1994)
Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure.
Transplantation **58**(8): 951-2
- Hammer, C. (2002)
Xenotransplantation for liver therapy or: Can porcine hepatocytes generate physiological functions sufficient for a human patient in ALF?
Int J Artif Organs **25**(10): 1019-28
- Haruyama, T., I. Ajioka, T. Akaike and Y. Watanabe (2000)
Regulation and significance of hepatocyte-derived matrix metalloproteinases in liver remodeling.
Biochem Biophys Res Commun **272**(3): 681-6
- He, Z. P., W. Q. Tan, Y. F. Tang, H. J. Zhang and M. F. Feng (2004)
Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers.
Cell Prolif **37**(2): 177-87
- Heller, R. A., M. Schena, A. Chai, D. Shalon, T. Bedilion, J. Gilmore, D. E. Woolley and R. W. Davis (1997)
Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays.
Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2150-5
- Iakova, P., S. S. Awad and N. A. Timchenko (2003)
Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest.
Cell **113**(4): 495-506
- Ikeda, H., I. Ogata and K. Fujiwara (1994)
Evidence that impaired intracellular collagen synthesis reduces proliferation in cultured rat hepatocytes.
Biochem Biophys Res Commun **200**(3): 1701-7
- Iocca, H. A. and H. C. Isom (2003)
Tumor necrosis factor-alpha acts as a complete mitogen for primary rat hepatocytes.
Am J Pathol **163**(2): 465-76
- Ismail, T., J. Howl, M. Wheatley, P. McMaster, J. M. Neuberger and A. J. Strain (1991)
Growth of normal human hepatocytes in primary culture: effect of hormones and growth factors on DNA synthesis.
Hepatology **14**(6): 1076-82
- Jamal, H. Z., T. C. Weglarz and E. P. Sandgren (2000)
Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity in vivo.
Gastroenterology **118**(2): 390-4
- Jiang, L., D. B. Carter, J. Xu, X. Yang, R. S. Prather and X. C. Tian (2004)
Telomere lengths in cloned transgenic pigs.
Biol Reprod **70**(6): 1589-93

Johnsen, S., T. Ermuth, E. Tanczos, H. Bannasch, R. E. Horch, I. Zschocke, M. Peschen, E. Schopf, W. Vanscheidt and M. Augustin (2005)
Treatment of therapy-refractive ulcera cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant.

Vasa **34**(1): 25-9

Joly, A., J. F. Desjardins, B. Fremond, M. Desille, J. P. Campion, Y. Malledant, Y. Lebreton, G. Semana, F. Edwards-Levy, M. C. Levy and B. Clement (1997)
Survival, proliferation, and functions of porcine hepatocytes encapsulated in coated alginate beads: a step toward a reliable bioartificial liver.

Transplantation. **63**: 795-803.

Katenz, E., F. W. Vondran, R. Schwartlander, G. Pless, X. Gong, X. Cheng, P. Neuhaus and I. M. Sauer (2007)

Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent.

Liver Transpl **13**(1): 38-45

Kim, I. M., T. Ackerson, S. Ramakrishna, M. Tretiakova, I. C. Wang, T. V. Kalin, M. L. Major, G. A. Gusarova, H. M. Yoder, R. H. Costa and V. V. Kalinichenko (2006)

The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer.

Cancer Res **66**(4): 2153-61

Kim, T. H., W. C. Bowen, D. B. Stolz, D. Runge, W. M. Mars and G. K. Michalopoulos (1998)

Differential expression and distribution of focal adhesion and cell adhesion molecules in rat hepatocyte differentiation.

Exp Cell Res **244**(1): 93-104

Kitada, T., S. Seki, N. Kawakita, T. Kuroki and T. Monna (1995)

Telomere shortening in chronic liver diseases.

Biochem Biophys Res Commun **211**(1): 33-9

Knittel, T., M. Mehde, D. Kobold, B. Saile, C. Dinter and G. Ramadori (1999)

Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1.

J Hepatol **30**(1): 48-60

Koniaris, L. G., I. H. McKillop, S. I. Schwartz and T. A. Zimmers (2003)

Liver regeneration.

J Am Coll Surg **197**(4): 634-59

Krupczak-Hollis, K., X. Wang, M. B. Dennewitz and R. H. Costa (2003)

Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through forkhead box m1b.

Hepatology **38**(6): 1552-62

Kudryavtsev, B. N., M. V. Kudryavtseva, G. A. Sakuta and G. I. Stein (1993)

Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle.

Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **64**(6): 387-93

Laconi, E., R. Oren, D. K. Mukhopadhyay, E. Hurston, S. Laconi, P. Pani, M. D. Dabeva and D. A. Shafritz (1998)

Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine.

Am J Pathol **153**(1): 319-29

- Lansdorp, P. M. (2000)
Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence.
Mech Ageing Dev **118**(1-2): 23-34
- Lazaro, C. A., E. J. Croager, C. Mitchell, J. S. Campbell, C. Yu, J. Foraker, J. A. Rhim, G. C. Yeoh and N. Fausto (2003)
Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes.
Hepatology **38**(5): 1095-106
- Levy, M. F., J. Crippin, S. Sutton, G. Netto, J. McCormack, T. Curiel, R. M. Goldstein, J. T. Newman, T. A. Gonwa, J. Banchereau, L. E. Diamond, G. Byrne, J. Logan and G. B. Klintmalm (2000)
Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus.
Transplantation **69**(2): 272-80
- Luo, Y., G. Levy, J. Ding, J. Qi, S. Chakbrati, B. M. Garcia, M. J. Phillips, N. Kumar, P. Friend, L. Noble, J. Macdonald, R. Zhong and D. Grant (2002)
HDAF transgenic pig livers are protected from hyperacute rejection during ex vivo perfusion with human blood.
Xenotransplantation **9**(1): 36-44
- Maas, R., G. Krupski, U. Meyer-Pannwitt, D. Henne-Bruns, B. Kremer, C. E. Brolsch and E. Bucheler (1993)
Liver regeneration in man. A prospective CT-volumetric study.
Rofo **158**(5): 456-62
- Maaser, K., M. Hopfner, H. Kap, A. P. Sutter, B. Barthel, B. von Lampe, M. Zeitz and H. Scherubl (2002)
Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors.
Br J Cancer **86**(4): 636-44
- Michalopoulos, G. K., W. C. Bowen, V. F. Zajac, D. Beer-Stolz, S. Watkins, V. Kostrubsky and S. C. Strom (1999)
Morphogenetic events in mixed cultures of rat hepatocytes and nonparenchymal cells maintained in biological matrices in the presence of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor.
Hepatology **29**(1): 90-100
- Mito, M., M. Kusano and Y. Kawaura (1992)
Hepatocyte transplantation in man.
Transplant Proc **24**(6): 3052-3
- Moreno Gonzalez, E., G. I. Garcia, S. C. Loinaz, S. R. Gomez, I. Gonzalez-Pinto, G. G. Hernandez, R. C. Jimenez, V. Maffettone, F. Perez-Cerda, A. C. Cisneros and et al. (1995)
Liver transplantation in patients with fulminant hepatic failure.
Br J Surg **82**(1): 118-21
- Müller, P., H. Aurich, R. Wenkel, I. Schäffner, I. Wolff, J. Walldorf, W. E. Fleig and B. Christ (2004)
Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes.
Cell Tissue Res **317**(1): 45-56
- Muraca, M., G. Gerunda, D. Neri, M. T. Vilei, A. Granato, P. Feltracco, M. Meroni, G. Giron and A. B. Burlina (2002)
Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a.
Lancet **359**(9303): 317-8

- Nagaki, M., A. Sugiyama, T. Naiki, Y. Ohsawa and H. Moriwaki (2000)
Control of cyclins, cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27, and cell cycle progression in rat hepatocytes by extracellular matrix.
J Hepatol **32**(3): 488-96
- Nagino, M., M. Ando, J. Kamiya, K. Uesaka, T. Sano and Y. Nimura (2001)
Liver regeneration after major hepatectomy for biliary cancer.
Br J Surg **88**(8): 1084-91
- Nozawa, K., Y. Kurumiya, A. Yamamoto, Y. Isobe, M. Suzuki and S. Yoshida (1999)
Up-regulation of telomerase in primary cultured rat hepatocytes.
J Biochem (Tokyo) **126**(2): 361-7
- Nur Adelina, A. N., B. S. Aminuddin, S. Munirah, K. H. Chua, N. H. Fuzina, L. Saim and B. H. Ruszymah (2004)
Phenotypic expression of collagen type II and collagen type I gene in monolayer culture of human auricular chondrocytes.
Med J Malaysia **59 Suppl B**: 188-9
- Odenthal, M., K. Neubauer, F. E. Baralle, H. Peters, K. H. Meyer zum Buschenfelde and G. Ramadori (1992)
Rat hepatocytes in primary culture synthesize and secrete cellular fibronectin.
Exp Cell Res **203**(2): 289-96
- Ohashi, K., F. Park and M. A. Kay (2001)
Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application.
J Mol Med **79**(11): 617-30
- Ohashi, K., M. Tsutsumi, Y. Nakajima, K. Kobitsu, H. Nakano and Y. Konishi (1996)
Telomere changes in human hepatocellular carcinomas and hepatitis virus infected noncancerous livers.
Cancer **77**(8 Suppl): 1747-51
- Okabe, H., S. Satoh, T. Kato, O. Kitahara, R. Yanagawa, Y. Yamaoka, T. Tsunoda, Y. Furukawa and Y. Nakamura (2001)
Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression.
Cancer Res **61**(5): 2129-37
- Ostrowska, A., D. C. Bode, J. Pruss, B. Bilir, G. D. Smith and S. Zeisloft (2000)
Investigation of functional and morphological integrity of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes.
Cell Tissue Bank **1**(1): 55-68
- Otsu, K., K. Ito, T. Kuzumaki and Y. Iuchi (2001)
Differential regulation of liver-specific and ubiquitously-expressed genes in primary rat hepatocytes by the extracellular matrix.
Cell Physiol Biochem **11**(1): 33-40
- Otsu, M. and F. Candotti (2002)
Gene therapy in infants with severe combined immunodeficiency.
BioDrugs **16**(4): 229-39

Ott, M. G., M. Schmidt, K. Schwarzwaelder, S. Stein, U. Siler, U. Koehl, H. Glimm, K. Kuhlcke, A. Schilz, H. Kunkel, S. Naundorf, A. Brinkmann, A. Deichmann, M. Fischer, C. Ball, I. Pilz, C. Dunbar, Y. Du, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, U. Luthi, M. Hassan, A. J. Thrasher, D. Hoelzer, C. von Kalle, R. Seger and M. Grez (2006)

Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1.

Nat Med **12**(4): 401-9

Otter, M., J. Kuiper, D. Rijken and A. J. van Zonneveld (1995)

Hepatocellular localisation of biosynthesis of vitronectin. Characterisation of the primary structure of rat vitronectin.

Biochem Mol Biol Int **37**(3): 563-72

Overturf, K., M. al-Dhalimy, C. N. Ou, M. Finegold and M. Grompe (1997)

Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes.

Am J Pathol **151**(5): 1273-80

Paradis, K., G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sandstrom, W. M. Switzer, L. E. Chapman, C. Lockey, D. Onions and E. Otto (1999)

Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group.

Science **285**(5431): 1236-41

Parsch, D., T. H. Brummendorf, W. Richter and J. Fellenberg (2002)

Replicative aging of human articular chondrocytes during ex vivo expansion.

Arthritis Rheum **46**(11): 2911-6

Petersen, B. E., J. P. Goff, J. S. Greenberger and G. K. Michalopoulos (1998)

Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat.

Hepatology **27**(2): 433-45

Pilarsky, C., M. Wenzig, T. Specht, H. D. Saeger and R. Grutzmann (2004)

Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data.

Neoplasia **6**(6): 744-50

Rapaport, E., R. F. Fishman and C. Gercel (1983)

Growth inhibition of human tumor cells in soft-agar cultures by treatment with low levels of adenosine 5'-triphosphate.

Cancer Res **43**(9): 4402-6

Ries, K., P. Krause, M. Solsbacher, P. Schwartz, K. Unthan-Fechner, B. Christ, P. M. Markus and I. Probst (2000)

Elevated expression of hormone-regulated rat hepatocyte functions in a new serum-free hepatocyte-stromal cell coculture model.

In Vitro Cell Dev Biol Anim **36**(8): 502-12

Roy, N. S., C. Cleren, S. K. Singh, L. Yang, M. F. Beal and S. A. Goldman (2006)

Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes.

Nat Med **12**(11): 1259-68

Rozga, J. (2006)

Liver support technology--an update.

Xenotransplantation **13**(5): 380-9

Rudolph, K. L., C. Trautwein, S. Kubicka, T. Rakemann, M. J. Bahr, N. Sedlacek, D. Schuppan and M. P. Manns (1999)

Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats.

Hepatology **30**(5): 1159-66

Runge, D., C. Kohler, V. E. Kostrubsky, D. Jager, T. Lehmann, D. M. Runge, U. May, D. B. Stolz, S. C. Strom, W. E. Fleig and G. K. Michalopoulos (2000)

Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes.

Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 333-41

Runge, D. M., D. Runge, K. Dorko, L. A. Pisarov, K. Leckel, V. E. Kostrubsky, D. Thomas, S. C. Strom and G. K. Michalopoulos (1999)

Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes.

J Hepatol **30**(2): 265-74

Sauer, I. M., D. Kardassis, K. Zeillinger, A. Pascher, A. Gruenwald, G. Pless, M. Irgang, M. Kraemer, G. Puhl, J. Frank, A. R. Muller, T. Steinmuller, J. Denner, P. Neuhaus and J. C. Gerlach (2003)

Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells.

Xenotransplantation **10**(5): 460-9

Schmid, R. (1999)

Prospect of gastroenterology and hepatology in the next century.

World J Gastroenterol **5**(3): 185-190

Seglen, P. O. (1976)

Preparation of isolated rat liver cells.

Methods Cell Biol **13**: 29-83

Seglen, P. O. (1997)

DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival.

Cell Biol Toxicol **13**(4-5): 301-15

Shay, J. W. and W. E. Wright (2001)

Aging. When do telomeres matter?

Science **291**(5505): 839-40

Shimaoka, S., T. Nakamura and A. Ichihara (1987)

Stimulation of growth of primary cultured adult rat hepatocytes without growth factors by coculture with nonparenchymal liver cells.

Exp Cell Res **172**(1): 228-42

Siegmund-Schultze, N. (2006)

Wer wann was wusste.

Süddeutsche Zeitung(10.05.2006)

Smanik, E. J., C. C. Yue and K. D. Mullen (1991)

"Old" livers don't regenerate in a week.

J Lab Clin Med **117**(2): 89-90

- Sokal, E. M., F. Smets, A. Bourgois, L. Van Maldergem, J. P. Buts, R. Reding, J. Bernard Otte, V. Evrard, D. Latinne, M. F. Vincent, A. Moser and H. E. Soriano (2003)
Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up.
Transplantation **76**(4): 735-8
- Stamatoglou, S. C., R. C. Hughes and U. Lindahl (1987)
Rat hepatocytes in serum-free primary culture elaborate an extensive extracellular matrix containing fibrin and fibronectin.
J Cell Biol **105**(5): 2417-25
- Stephene, X., M. Najimi, F. Smets, R. Reding, V. de Goyet Jde and E. M. Sokal (2005)
Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation.
Am J Transplant **5**(8): 2058-61
- Strehl, R., K. Schumacher, U. de Vries and W. W. Minuth (2002)
Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering.
Tissue Eng **8**(1): 37-42
- Strom, S. C., R. A. Fisher, W. S. Rubinstein, J. A. Barranger, R. B. Towbin, M. Charron, L. Miele, L. A. Pizarov, K. Dorko, M. T. Thompson and J. Reyes (1997a)
Transplantation of human hepatocytes.
Transplant Proc **29**(4): 2103-6
- Strom, S. C., R. A. Fisher, M. T. Thompson, A. J. Sanyal, P. E. Cole, J. M. Ham and M. P. Posner (1997b)
Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure.
Transplantation **63**(4): 559-69
- Tateno, C., K. Takai-Kajihara, C. Yamasaki, H. Sato and K. Yoshizato (2000)
Heterogeneity of growth potential of adult rat hepatocytes in vitro.
Hepatology **31**(1): 65-74
- Terry, C., A. Dhawan, R. R. Mitry, S. C. Lehec and R. D. Hughes (2005)
Preincubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing.
Liver Transpl **11**(12): 1533-1540
- Thevananther, S., H. Sun, D. Li, V. Arjunan, S. S. Awad, S. Wyllie, T. L. Zimmerman, J. A. Goss and S. J. Karpen (2004)
Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes.
Hepatology **39**(2): 393-402
- Tseng, S. C., E. A. Smuckler and R. Stern (1983)
Types of collagen synthesized by normal rat liver hepatocytes in primary culture.
Hepatology **3**(6): 955-63
- Tsukamoto, I., R. Nakata and S. Kojo (1993)
Effect of ageing on rat liver regeneration after partial hepatectomy.
Biochem Mol Biol Int **30**(4): 773-8
- van de Kerkhove, M. P., R. Hoekstra, R. A. Chamuleau and T. M. van Gulik (2004)
Clinical application of bioartificial liver support systems.
Ann Surg **240**(2): 216-30

- Velikonja, N. K., G. Wozniak, E. Malicev, M. Knezevic and M. Jeras (2001)
Protein synthesis of human articular chondrocytes cultured in vitro for autologous transplantation.
Pflugers Arch **442**(6 Suppl 1): R169-70
- Vickers, A. E., M. Saulnier, E. Cruz, M. T. Merema, K. Rose, P. Bentley and P. Olinga (2004)
Organ slice viability extended for pathway characterization: an in vitro model to investigate fibrosis.
Toxicol Sci **82**(2): 534-44
- Vilei, M. T., A. Granato, C. Ferrareso, D. Neri, P. Carraro, G. Gerunda and M. Muraca (2001)
Comparison of pig, human and rat hepatocytes as a source of liver specific metabolic functions in culture systems--implications for use in bioartificial liver devices.
Int J Artif Organs **24**(6): 392-6
- Walldorf, J., H. Aurich, H. Cai, D. Runge, B. Christ, S. C. Strom and W. E. Fleig (2004)
Expanding hepatocytes in vitro before cell transplantation: donor age-dependent proliferative capacity of cultured human hepatocytes.
Scand J Gastroenterol **39**(6): 584-93
- Wang, X., H. Kiyokawa, M. B. Dennewitz and R. H. Costa (2002)
The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration.
Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16881-6
- Wang, X., E. Quail, N. J. Hung, Y. Tan, H. Ye and R. H. Costa (2001)
Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver.
Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11468-73
- Watanabe, F. D., C. J. Mullon, W. R. Hewitt, N. Arkadopoulos, E. Kahaku, S. Eguchi, T. Khalili, W. Arnaout, C. R. Shackleton, J. Rozga, B. Solomon and A. A. Demetriou (1997)
Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial.
Ann Surg **225**(5): 484-91
- Webber, E. M., J. Bruix, R. H. Pierce and N. Fausto (1998)
Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat.
Hepatology **28**(5): 1226-34
- Weber, A., D. Mahieu-Caputo, M. Hadchouel and D. Franco (2006)
Hepatocyte transplantation: studies in preclinical models.
J Inherit Metab Dis **29**(2-3): 436-41
- Wege, H., M. S. Chui, H. T. Le, S. C. Strom and M. A. Zern (2003)
In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging.
Cell Transplant **12**(8): 897-906
- Weglarz, T. C., J. L. Degen and E. P. Sandgren (2000)
Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes.
Am J Pathol **157**(6): 1963-74
- Wegner, H., W. Schareck, H. Bayer-Helms and R. Gebhardt (1992)
Different proliferative potential of rat and pig hepatocytes in pure primary culture and coculture.
Eur J Cell Biol **58**(2): 411-7

Wonsey, D. R. and M. T. Follettie (2005)

Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe.

Cancer Res **65**(12): 5181-9

Woods, N. B., V. Bottero, M. Schmidt, C. von Kalle and I. M. Verma (2006)

Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma.

Nature **440**(7088): 1123

Yamada, T., F. Okajima, M. Akbar, H. Tomura, T. Narita, S. Ohwada, Y. Morishita and Y. Kondo (2002)

Cell cycle arrest and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells exposed to adenosine triphosphate in vitro.

Oncol Rep **9**(1): 113-7

Yang, Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai and T. P. Speed (2002)

Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation.

Nucleic Acids Res **30**(4): e15

Ye, H., A. X. Holterman, K. W. Yoo, R. R. Franks and R. H. Costa (1999)

Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase.

Mol Cell Biol **19**(12): 8570-80

Zhou, X.-D., T. Tokiwa, J. Kano and M. Kodama (1998)

Isolation and primary culture of adult pig hepatocytes.

Methods in Cell Science. **19**: 277-284.

Chemikalienverzeichnis

2-AAF	Sigma-Aldrich (München)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
2x PCR Mastermix	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
6x Blaupuffer	Peqlab (Erlangen)
Aceton	Fluka (Neu-Ulm)
Acrylamid/Bisacrylamid (30% w/v)	Serva (Heidelberg)
AEC+ High Sensitivity Substrate Chromogen (ready-to-use)	Dako, Hamburg
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Merck (Darmstadt)
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (München)
Antipain	Sigma-Aldrich (München)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (München)
APS	Roth (Karlsruhe)
ATP	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Atropin	B.Braun (Melsungen)
<i>BamHI</i>	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau-Natriumsalz	Merck (Darmstadt)
BSA	Sigma-Aldrich (München)
BSA-Standard (1mg/ml)	Sigma-Aldrich (München)
Calciumchloriddihydrat	Merck (Darmstadt)
ChemMate® Antibody Diluent (ready-to-use)	Dako (Hamburg)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
CIAP	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Collagen R	Serva (Heidelberg)
CPT-cAMP	Sigma-Aldrich (München)
DAB-Chromogen	Dako (Hamburg)
DAKO Antibody Diluent, Background Reducing (ready-to-use)	Dako (Hamburg)
DAKO Protein block serum-free (ready-to-use)	Dako (Hamburg)
DAPI (ready-to-use)	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI Vectashield®	Vector (Burlingame, USA)
dATP	Promega (Mannheim)
dCTP	Promega (Mannheim)
dCTP-Cy3	Amersham Biosciences (Freiburg)
dCTP-Cy5	Amersham Biosciences (Freiburg)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (München)
D-Galactose	Roth (Karlsruhe)
D-Glucose	Merck (Darmstadt)
dGTP	Promega (Mannheim)
Diacetylmonoxim	Fluka (Neu-Ulm)
Dicumarol	Sigma-Aldrich (München)
Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich (München)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
DMEM (4,5 g/l Glucose)	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM (ohne Glucose)	Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
DNase I	Sigma-Aldrich (München)
DNase I (ready-to-use)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
dTTP	Promega (Mannheim)
E-64	Sigma-Aldrich (München)
ECL-Lösung	Amersham Biosciences (Freiburg)
<i>EcoRI</i>	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Effectene Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
EGF	PeptoTech (London, UK)

Anhang

EGTA	Roth (Karlsruhe)
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Ethoxyresorufin	Sigma-Aldrich (München)
Ethanol (100%)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (96%)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (München)
FKS	CCPro (Neustadt)
Forene [®]	Abbott (Wiesbaden)
Gentamycin	Biochrom (Berlin)
Glutardialdehyd	Roth (Karlsruhe)
Glycerin (87%)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Glycin	Serva (Heidelberg)
Harnstoff-Standard (75 µg/ml)	Sigma-Aldrich (München)
HBSS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Invitrogen (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hematoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich (München)
HEPES	Serva (Heidelberg)
HGF	Pan Biotech (Aidenbach)
HMDS	Fluka (Neu-Ulm)
Insulin	Sigma-Aldrich (München)
Isoamylalkohol	Fluka (Neu-Ulm)
Isopropanol	Fluka (Neu-Ulm)
ITS-Supplement	Roche Diagnostics (Mannheim)
Kaliumacetat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Ketavet [®]	Parke Davis Pharmacia (Erlangen)
Klenow Fragment	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Kollagenase CLS II	Biochrom (Berlin)
Kollagenase Typ 1	Worthington (Lakewood, USA)
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck (Darmstadt)
L-15	CCPro (Neustadt)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (München)
L-Glutamin	Merck (Darmstadt)
Liquemin [®] N 25000	Roche (Mannheim)
L-Ornithin	Serva (Heidelberg)
L-Prolin	Serva (Heidelberg)
Magermilchpulver	Sucofin (Zeven)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich (München)
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	Merck (Darmstadt)
MEM nach Eagle	Sigma-Aldrich (München)
Methanol	Fluka (Neu-Ulm)
Mitomycin C	Serva (Heidelberg)
M-MLV reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumorthovanadat	Applichem (Darmstadt)
Niacinamid	Sigma-Aldrich (München)
oligo(dT) ₁₈ -Primer	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
ortho-Phosphorsäure	Fluka (Neu-Ulm)
Osmiumtetroxid	Fluka (Neu-Ulm)
Paraformaldehyd	Fluka (Neu-Ulm)

Anhang

PBS, Dulbecco, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	CCPro (Neustadt)
Pentobarbital	Sigma-Aldrich (München)
Pentoxiresorufin	Sigma-Aldrich (München)
Pepstatin	Sigma-Aldrich (München)
Pepton/Trypton	Roth (Karlsruhe)
Pfu-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Phenol	Sigma-Aldrich (München)
PMSF	Roth (Karlsruhe)
Ponceau S-Rot	Merck (Darmstadt)
Pronase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Propofol	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Proteinase K (ready-to-use)	Dako, Hamburg
Rainbow-Marker	Amershan Biosciences (Freiburg)
Random-Primer (0,5 µg/µl)	Promega (Mannheim)
Rattenserum	CCPro (Neustadt)
Resorufin	Sigma-Aldrich (München)
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce Science (Bonn)
Retrorsin	Sigma-Aldrich (München)
RNase OUT Ribonuklease Inhibitor	Invitrogen (Karlsruhe)
Salzsäure (37%)	Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure (98%)	Fluka (Neu-Ulm)
SDS	Roche Diagnostics (Mannheim)
Sonnenblumenöl	Sigma-Aldrich (München)
Stresnil®	Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgien)
SuperScript II reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
T61	Intervet (Unterschleißheim)
Target Retrieval Solution (ready-to-use)	Dako (Hamburg)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Thioharnstoff	Fluka (Neu-Ulm)
Thiosemicarbazid	Fluka (Neu-Ulm)
TNFα	Strathmann Biotech (Hannover)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Gibco BRL (Eggenstein)
Triton X-100	Merck (Darmstadt)
TRIzol®	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypanblau, 0,4 % (ready-to-use)	Sigma-Aldrich (München)
Trypsin (0,05 %) / EDTA (0,02 %)	CCPro (Neustadt)
Tween 20	Sigma-Aldrich (München)
Vybrant® DiI	Molecular Probes
Wasserstoffperoxid 0,3 %	Sigma-Aldrich (München)
Ziegenserum	CCPro (Neustadt)
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich (München)
Zinksulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich (München)
β-Naphtoflavon	Fluka (Neu-Ulm)
β-Glucuronidase/Arylsulfatase	Roche Diagnostics (Mannheim)

Anhang

Gen		Sequenz (5' → 3')	Fragment- größe	Annealing- temperatur	Anzahl Zyklen
Primer zur Verifizierung der Ergebnisse der Microarray-Analysen					
α ₁ Typ I Kollagen	S	AAGAGCGGAGAGTACTGGATC	353	64	10+17
	AS	AGCAGGGACTTCTTGAGGTTG			
α ₂ Typ V Kollagen	S	AGGTCCGGCTGGTAATGATG	350	62	10+24
	AS	CACTTCCTTGTTCAACCATTG			
Fibronectin	S	GCCGTGGTCCTAACAAATCTC	396	68	10+11
	AS	ATCTCTCGGGACATCGGAAAC			
Vitronectin	S	CAGGAGGAATGTGAAGGAAGC	357	64	10+22
	AS	CAAAGAGAACCAGACTGAACGC			
MMP2	S	TTTATTTGGCGGACAGTGACAC	350	64	10+21
	AS	TCTGCGATGAGCTTAGGGAAAC			
MMP9	S	CCTCAAGTGGCACCATCATAAC	369	66	10+24
	AS	AAGGTGAAGGGAAAGTGACATG			
MMP13	S	TCCCGAGACCTCATGTTTCATC	380	64	10+24
	AS	AAGGAATTCGTTGGCATGACTC			
TIMP1	S	CCTCTGGCATCCTCTTGTTG	371	62	10+20
	AS	CAGATTATGCCAGGGAACCAG			
TIMP2	S	CAAAGCAGTGAGCGAGAAGG	413	62	10+23
	AS	GCCCATGATGCTCTTCTCT			
TIMP3	S	AGCCTCTGAAAGTCTCTGTG	355	60	10+17
	AS	ATTGCTGATGCTCTTGCTCTG			
CK19	S	ACTTGCGCGACAACATCCTTG	445	61	10+24
	AS	ACAGCGACCTGGGTGTTCAAC			
CX43	S	CCTCCTGTAAGTGGCCCATGTG	400	64	10+18
	AS	AGCGAGAGACACCAAGGACACC			
Desmin	S	CAGGTAGGAGATGGACATG TC	443	62	10+23
	AS	TTCCGGTAGGTGGCAATCTC			
αSMA	S	TCATCACCAACTGGGACGACA	365	62	10+10
	AS	CAGGATCTTCATGAGGTAGTC			
Nestin	S	TCGCTTAGAGGTGCAACAGC	165	61	10+21
	AS	CTCTGTAGACCTTGCTTCTCC			
Vimentin	S	AGATCGATGTGGACGTTTCC	198	59	10+18
	AS	TCCGGTATTCGTTTGACTCC			
Thy1	S	CAGTCATCAGCATCACTCTCC	215	60	10+17
	AS	GTAAGTGTGCTCGGGAACC			
CK18	S	TGAGGGCTCAGATCTTTGCG	401	61	10+15
	AS	CTTGTCCAGTTCTCACGGTTC			
CX32	S	TGGCGTGAATCGGCATTCTAC	406	61	10+19
	AS	CTCAAACAGCAGCCGGAACAC			
HNF4α	S	GGTGCCAACCTCAACTCATCC	400	61	10+16
	AS	CCCGAATGTCGCCATTGATC			
Transferrin	S	GTGGCCTTTGTCAAGCA	565	53	10+12
	AS	CTCCATCCAAGCTCATG			
PCK1	S	GGCCGCACCATGTATG	398	52	10+21
	AS	AGGATCAGCATGTGCTC			
Fox m1	S	TCCAGAGCATCATCACAGCG	391	59	10+20
	AS	TGCTCCAGGTGACAATTCTCC			
HGF-Rezeptor	S	CAAAAAGTTTGTCCACAGAGAC	470	57	10+18
	AS	CGTTCACATGGACATAGTGCT			
EGF-Rezeptor	S	TTCTTAAAGACCATCCAGGAG	688	56	10+25
	AS	ACGAGCCGTGATCTGTAC			

Anhang

CD26	S	ATAGTAGCTAGCTTTGATGGCA	398	62	10+18
	AS	CAGCTCTGCTCATGACTGTTG			
18S-RNA ¹⁷	S	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	346	62	10+21
	AS	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC			
Primer zur Charakterisierung kultivierter Rattenhepatozyten					
CK18	S	TGAGGGCTCAGATCTTTGCG	401	61	21
	AS	CTTGTCCAGTTCCTCACGGTTC			
CX32	S	TGGCGTGAATCGGCATTCTAC	406	61	23
	AS	CTCAAACAGCAGCCGGAACAC			
PCK1	S	GGCCGCACCATGTATG	398	52	33
	AS	AGGATCAGCATGTGCTC			
CPS I	S	AAGATGCAGGTGTCCACTCAGG	424	65	28
	AS	AAACACGCCACCTCTCCAGTAG			
CYP1A1	S	CCAATGTCATCTGTGCCAT	380	60	28
	AS	TGTGTCAAACCCAGCTCC			
GAPDH	S	GACCCCTTCATTGACCTC	803	56	26
	AS	GCAATGCCAGCCCCAG			
Primer zur Amplifikation des humanen Fox m1b					
Fox m1b	S	CGGAATTCATGAAAACACTAGCCCCCGTC		57	36
	AS	CGGGATCCCTACTGTAGCTCAGGAATAA			
Primer für die SMART-Amplifikation					
SMART-Oligo		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC GGG ¹⁸		42°C	1
RT Primer		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT ₍₃₀₎ VN ¹⁹		42°C	1
PCR Primer		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		65°C	18

Tabelle 4: Primersequenzen, Annealingtemperaturen, Zyklenzahlen

¹⁷ Aufgrund der relativen Häufigkeit der mRNA für 18S-RNA wurde als Template für die 10 Zyklen-PCR eine 1:10 mit dest. Wasser verdünnte cDNA eingesetzt.

¹⁸ **GGG** = ribosyliertes Guanosintriphosphat

¹⁹ **V** = A, G, oder C, **N** = A; C, G, T

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. B. Christ für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, als Mitglied seiner Arbeitsgruppe „Molekulare Hepatologie“ wissenschaftlich tätig zu sein. Er hat mich stets unterstützt und mir mit Ideen und Vorschlägen an so mancher Stelle weitergeholfen.

Weiterhin möchte ich mich bei den Doktoren H. Aurich, I. Aurich, R. Haftdorn, P. Müller-Stock sowie I. Schäffner für ihre stete Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen sowie die zahlreichen Anregungen bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe „Molekulare Hepatologie“ danke ich für die freundliche Aufnahme und die Geduld, die mir entgegengebracht wurde. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Frau M. Hempel und Frau S. Ebensing, die mir stets und auch an zahllosen Wochenenden hilfreich zur Seite standen, um mich bei der Bewältigung der täglichen und nicht alltäglichen Laborarbeiten zu unterstützen.

Herrn Prof. Haerting und Frau S. Behl gilt mein Dank für ihre Hinweise und Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Auswertungen.

Ich danke Frau Dr. S. König, Frau Dr. P. Krause und Frau S. Goldmann von der Klinik und Poliklinik für Allgemeinchirurgie der Georg-August-Universität Göttingen sowie den Doktoren T. Böttger, V. Christov und H. Lehnich vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Herrn Dr. R. Wenkel vom Institut für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei den Kollegen vom Prodekanat Forschung sowie bei allen Arbeitsgruppen im Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung (ZAMED) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für ihre fachübergreifende Unterstützung bedanken.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben und aus benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.



Christian Schneider

Halle (Saale), 10.04.2007

Wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Aurich, H., S. Koenig, C. Schneider, J. Walldorf, P. Krause, W. E. Fleig and B. Christ (2005)

Functional characterization of serum-free cultured rat hepatocytes for downstream transplantation applications.

Cell Transplant **14**(7): 497-506

Schneider, C., H. Aurich, R. Wenkel and B. Christ (2006)

Propagation and functional characterization of serum-free cultured porcine hepatocytes for downstream applications.

Cell Tissue Res **323**(3): 433-442

Koenig, S., H. Aurich, C. Schneider, P. Krause, R. Haftendorn, H. Becker and B. Christ (2007)

Zonal expression of hepatocytic marker enzymes during liver repopulation.

Histochem Cell Biol (submitted for publication)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Christian Schneider
geb. 18.09.1972 in Wippra
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung

09/1990 - 06/1993 Berufsausbildung zum Instandhaltungsmechaniker mit Abitur bei der Walzwerk Hettstedt AG

10/1994 - 03/1999 Biotechnologie-Studium an der Hochschule Anhalt (FH) mit Schwerpunkt Umweltbiotechnologie und Hygienetechnik

Berufliche Praxis

04/1999 - 12/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06/2002 – 03/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Molekulare Hepatologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Seit 04/2006 Validierungsingenieur bei der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main

Wehrdienst

10/1993 - 09/1994 Richtschütze auf SPZ Marder



Halle (Saale), 10.04.2007