

**Endodermale Differenzierung von
unrestringierten, somatischen Stammzellen
(USSC) aus dem Nabelschnurblut**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Sensken

aus Wesel

Düsseldorf 2005

Aus dem
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Universitätskliniken der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Gesine Kögler

Koreferent: Prof. Dr. Detlev Riesner

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2006



Ein Adler frisst die Leber von Prometheus
(Lakonische Schale, 550 v. Chr.)

Prometheus wurde von Hephaistos an einen Felsen geschmiedet, weil er das Feuer von den Göttern gestohlen und es den Menschen gebracht hatte.

Täglich kam ein Adler zu ihm und fraß von seiner Leber, die sich in jeder Nacht wieder erneuerte.

Danksagung

Prof. Dr. Peter Wernet möchte ich danken, dass ich diese interessante Doktorarbeit in seinem Institut anfertigen konnte.

Danke auch an Prof. Dr. Detlev Riesner, der die Co-Betreuung aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät für mich übernommen hat.

Für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium möchte ich mich bei der Düsseldorfer Entrepreneurs Foundation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gesine Kögler, die mich in den letzten vier Jahren hervorragend betreut hat. Frau Prof. Dr. Kögler hat mich bei dieser Arbeit stets unterstützt und mich immer wieder zu neuen Ideen und Ansätzen angeregt. Außerdem ermöglichte sie mir flexibles und eigenständiges Arbeiten und einige Aufenthalte in kooperierenden Laboren.

Danke an PD Dr. Rüdiger Sorg für die Bezähmung des Durchflusszytometers sowie der Espressomaschine und an Dr. Thorsten Trapp für Schneiden, Färben und Hilfe bei den Cokulturen. Dr. Jürgen Enczmann und Dr. Jörg Bender danke ich für die Hilfe bei der Etablierung der Primer und der RT-PCR. Danke an Dr. Ingo Trompeter für die Einführung in die große Welt der Klonierung und Dr. Bernd Giebel für die Einweisung ins Mikroskopieren. Gabi Tillmann, Damian Marx und Matern Göbel möchte ich für ihre Hilfe bei Hybridisierungen, Blots und Freihalten von PCR-Maschinen danken.

Der Container-Crew vielen Dank für gemeinsames Schwitzen im Sommer und Frieren im Winter. Ein großes Dankeschön an Mahtab und Aurélie für ihre unermüdliche Hilfe im Labor. Andrea, Claudia und Lutz vielen Dank für die Hilfe bei Bestellungen, Transporten sowie sonstigem bürokratischem Papierkram und natürlich für die lustigen Stunden bei diversen Festivitäten. Vielen Dank an Teja und Zakir für geteiltes Leid während der Promotion. Andrea und Teja danke ich zudem für jede Menge kleine und große Buchstaben und vor allem für unzählige Bindestriche!

Allen Uhrbergs vielen Dank für immer nette Hilfe, ein Plätzchen zur RNA-Aufreinigung und zum Gele-Fahren, sowie „Ausleihen“ von LB-Medium und -Platten...

Anja und Jin, ihr seid die Besten! Euch noch viel Durchhaltevermögen und ich sach ma auf die Leber (und das Herzchen)! Julchen, Dankeschön für unzählige nette Mittagessen und jede Menge Ablenkung im McLaughlins!

Danke an meine Familie für immerwährende Unterstützung und Rückhalt.

Karl-Werner, danke für einfach alles.

Inhaltsverzeichnis.....	I
-------------------------	---

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
----------------------------	----

1 Einleitung

1.1 Die Leber.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion der Leber.....	1
1.1.2 Entwicklung und Genexpression der Leber.....	3
1.1.3 Erkrankungen der Leber.....	4
1.2 Das Pankreas.....	6
1.2.1 Aufbau und Funktion des Pankreas.....	6
1.2.2 Entwicklung und Genexpression des Pankreas.....	6
1.2.3 Erkrankungen des Pankreas.....	10
1.3 Stammzellen.....	11
1.3.1 Embryonale Stammzellen.....	12
1.3.2 Adulte Stammzellen.....	17
1.3.2.1 Hämatopoietische Stammzellen (HSC).....	18
1.3.2.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	20
1.3.2.3 Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC).....	22
1.3.2.4 Unselektionierte mononukleäre Zellen (MNC).....	23
1.3.2.5 Unrestrictierte somatische Stammzellen (USSC).....	25
1.3.2.6 Stammzellen in Leber- und Pankreasgewebe.....	26
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	29

2 Material und Methoden

2.1 Generierung der USSC.....	30
2.1.1 Aufarbeitung des Nabelschnurblutes.....	30
2.1.2 Passagieren der Zellen.....	32
2.1.3 Zellzahlbestimmung.....	32
2.1.4 Kryokonservierung der Zellen.....	32
2.1.5 Auftauen der Zellen.....	33
2.2 Charakterisierung der USSC	33
2.2.1 Immunphänotypische Markierung und Durchflußzytometrie.....	33
2.2.2 Statistische Auswertung.....	35
2.3 Nachweis der Genexpression.....	35

2.3.1	RNA Isolation.....	35
2.3.2	RT-PCR.....	36
2.3.3	Southern Blot und Hybridisierung.....	38
2.3.4	Gelsysteme.....	41
2.4	Transfektion.....	42
2.4.1	Plasmid.....	42
2.4.2	Amplifikation des Plasmides.....	43
2.4.3	Aufreinigung des Plasmides.....	43
2.4.4	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	44
2.4.5	Restriktionsverdau.....	44
2.4.6	Nukleofektion.....	44
2.4.7	Selektion der transfizierten Zellen.....	45
2.5	Schnitte und Färbungen.....	45
2.5.1	Gewebe und Zellen.....	45
2.5.2	Gefrierschnitte.....	45
2.5.3	Färbungen.....	46
2.5.3	Western Blot.....	48
2.6	Differenzierung der USSC.....	48
2.6.1	<i>In vivo</i> Systeme.....	48
2.6.2	<i>In vitro</i> Systeme.....	49
3	Ergebnisse	
3.1	Charakterisierung der USSC.....	55
3.2	Endodermale Differenzierung.....	59
3.2.1	<i>In vivo</i> Systeme.....	59
3.2.1.1	<i>In utero</i> Schaf Modell.....	59
3.2.1.2	uPA-SCID Maus Modell.....	60
3.2.2	<i>In vitro</i> Systeme.....	61
3.2.2.1	Differenzierung durch Faktoren.....	64
3.2.2.2	Cokulturen.....	71
3.2.2.3	Überexpression eines endodermalen Genes.....	83
4	Diskussion	
4.1	Endodermale Differenzierung der USSC im <i>in vivo</i> Modell.....	85
4.2	Endodermale Genexpression.....	89

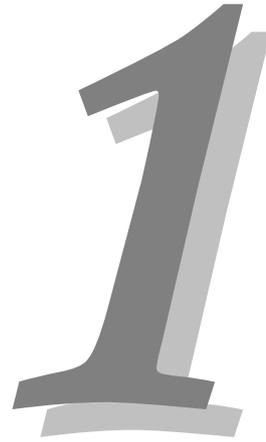
4.3	Endodermale Differenzierung der USSC durch Faktoren.....	92
4.4	Endodermale Differenzierung der USSC durch Cokulturen.....	95
4.5	Endodermale Differenzierung der USSC durch Überexpression.....	100
4.6	Transdifferenzierung, Heterogenität und Fusion.....	101
4.7	Ausblick.....	104
5	Zusammenfassung.....	106
A	Übersicht der faktorinduzierten Differenzierung.....	108
B	Übersicht über die verschiedenen Cokulturen.....	111
	Literatur.....	116

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
a-Feto	α-Fetoprotein
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bFGF	fibroblastic growth factor basic
BMMNC	bone marrow MNC
BMP2	bone morphogenic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CM	Konditioniertes Medium
Cyp2B6	Cytochrom P450/2B6
Cyp3A4	Cytochrom P450/3A4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (Färbung)
dCoK	Direkte Cokultur
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	embryoid body
ECC	Embryonale Karzinom-Zelle
EGC	Primordiale Keimzelle
EGF	Epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ESC	Embryonale Stammzelle
EtBr	Ethidium Bromid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälber Serum
FGF	fibroblastic growth factor
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase
GATA4	GATA binding protein 4
GFP	green fluorescent protein
Gys2	Glykogen Synthase 2
HBM	Hepatocyte basal medium
HCM	Hepatocyte culture Medium
hEGF	human epidermal growth factor
HGF	hepatocyte growth factor
HLA	human leukocyte antigen
HNF	hepatocyte nuclear factor
HNF3b	hepatocyte nuclear factor 3 β
HNF4a	hepatocyte nuclear factor 4 α
HRP	horseradish peroxidase
HSA	Humanes Serum Albumin
HSC	Hämatopoietische Stgammzelle
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IHC	Immunohistochemie
IMEM	Improved Minimum Essential Medium
IRES	internal ribosomal entry site
ISL-1	islet-1
LB	LB-Medium (Luria Broth)
LIF	leukemia inhibitory factor
M	molar (Mol/l)
MAPC	Multipotente Progenitorzelle
MNC	Mononukleäre Zellen
MODY	maturity onset diabetes of the young
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NeuroD	neurogenic differentiation 1
NGF	nerve growth factor
Nkx6.1	NK6 transcription factor related, locus 1
NOD	nonobese diabetic
OB	organoid bodies
OSM	Oncostatin M

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Periodic-Acid-Schiff (Färbung)
Pax4	paired box gene 4
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PDX-1	insulin promoter factor 1
PE	Phycoerythrin
PSC	Pluripotente Stammzelle
RA	Retinolsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion
SCF	stem cell factor
SCID	severe combined immunodeficiency
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodium dodecyl sulphate
STM	Septum Transversum Mesenchym
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TW	Transwell
uPA	Urokinase-Typ-Plasminogen Aktivator
USSC	Unrestringierte, somatische Stammzelle
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
w/v	Gewicht pro Volumen

Einleitung



1.1 Die Leber

1.1.1 Aufbau und Funktion der Leber

Die Leber als eines der größten Organe des Menschen ist aus vier Leberlappen aufgebaut (Abb.1.1). Sie hat für den Organismus viele lebenswichtige Aufgaben: Während der Embryonalentwicklung bildet sie bis zum siebten Schwangerschaftsmonat das Blut des Fötus und ist auch danach durch die Produktion von Gerinnungsfaktoren und Abbau der Erythrozyten zu Billirubin weiter am Blutstoffwechsel beteiligt. Des Weiteren filtert die Leber Giftstoffe (z.B. Ammoniak, Medikamente und Alkohol) aus dem Körper und baut sie zu unschädlichen Substanzen um. Diese werden dann über die Nieren in den Urin oder in die von der Leber produzierte Gallenflüssigkeit abgegeben.

Die Leber reguliert den Glukosehaushalt indem sie in der Glukoneogenese überschüssige Glukose zu Glykogen umbaut und daraus in Hungerphasen Glukose wieder aufbaut. Zudem bildet sie Aminosäuren für die Proteinbiosynthese und produziert das Serumprotein Albumin. Außerdem ist das Organ für die Energiegewinnung, den Aufbau von Speicherfett und den Umbau von Lipiden zuständig. Weiterhin ist die Leber an der Regulation des Säure-Base Haushaltes und des Stoffwechsels von Spurenelementen und Vitaminen beteiligt.

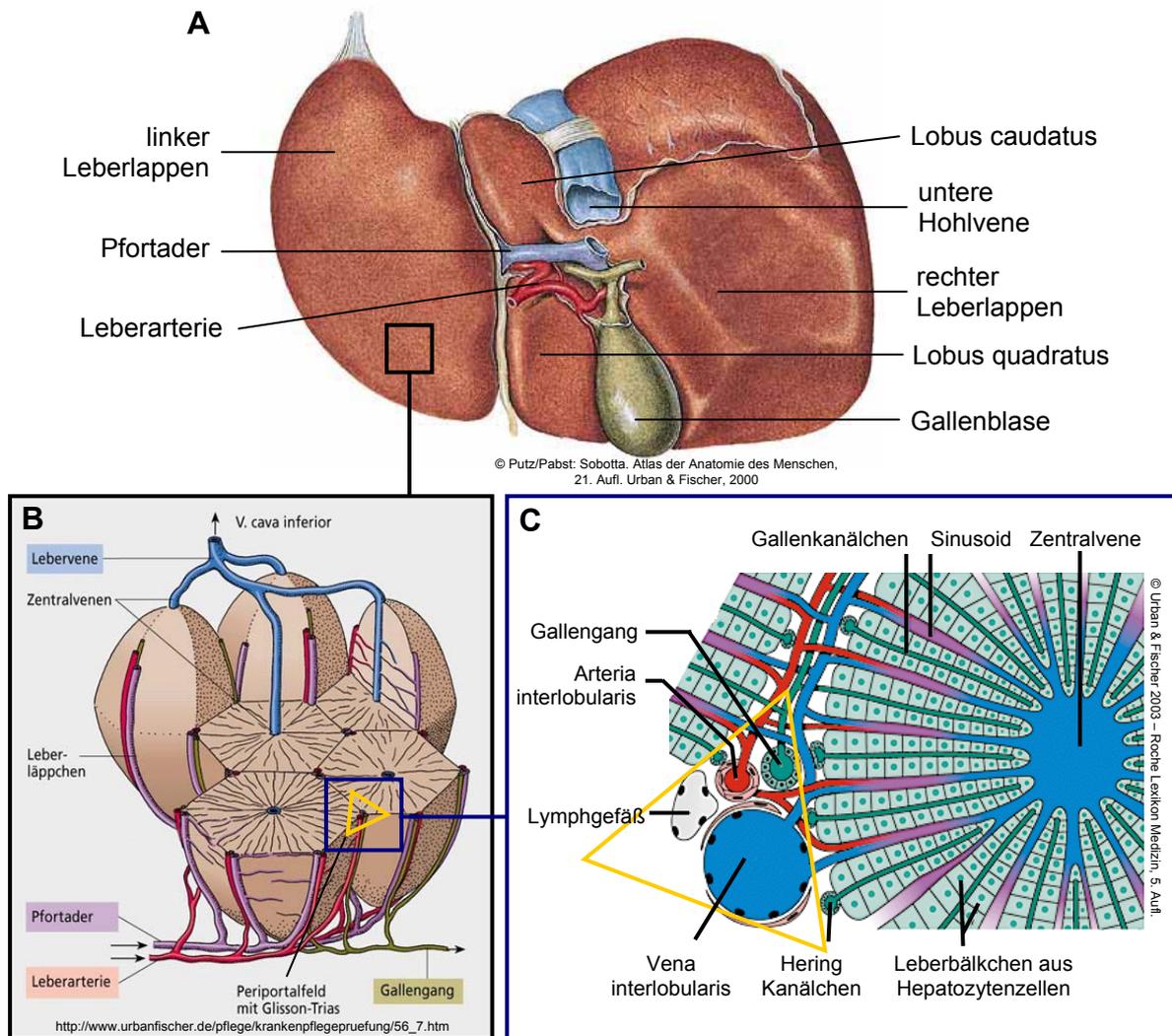


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Leberaufbaus. **A** ganzes Organ, **B** Übersicht eines funktionellen Leberläppchens, **C** Ausschnittvergrößerung von B. Das gelbe Dreieck kennzeichnet das Periportalfeld (Glisson-Dreieck), an dem mehrere Leberläppchen aneinander grenzen; es enthält je einen Ast der Vena- und Arteria interlobularis (aus der Pfortader bzw. Leberarterie), einen Gallengang sowie kleinste Lymphgefäße. Am Rande des Läppchens fließen sauerstoffreiches Blut der Arterie und sauerstoffärmeres Blut der Pfortader zusammen. Die Anfangsabschnitte der Gallengänge heißen Hering-Kanälchen. (© Urban & Fischer / Elsevier)

Die Hauptzellen der Leber sind die Hepatozyten, sie bilden die so genannten Leberbälkchen aus, an deren äußerer Seite die blutführenden Sinusoide und auf der inneren Seite die Gallenkanälchen liegen (Abb.1.1). Die Zellen der Gallengangsepithelien (Cholangiozyten) dichten die Wand zu den Gallenkanälchen ab und bilden zusammen mit den Hepatozyten die Gallenflüssigkeit, welche aus den Leberläppchen heraus in Richtung des jeweiligen Glissonschen Dreiecks fließen. Auf der Seite der Lebersinusoide finden sich auskleidende Endothelzellen, die Stoffe aus

dem Blut aufnehmen oder abgeben und in engem Kontakt mit den Hepatozyten stehen. Zwischen den Endothelzellen finden sich auch die Kupfferschen Sternzellen, das lebereigene Immunsystem, welches das Blut von Fremdstoffen, wie Bakterien, überzähligen und geschädigten Erythrozyten sowie Zelltrümmern befreit (Zaret 2002; Duncan 2003), (Speckmann & Wittkowski, Bau und Funktion des menschlichen Körpers; 20 Aufl. Urban & Fischer).

1.1.2 Entwicklung und Genexpression der Leber

Am Anfang der Embryonalentwicklung bildet sich aus der befruchteten Eizelle nach einigen Tagen die Blastozyste, die sich wenig später zur Gastrula entwickelt (Abb.1.5). Zu diesem Zeitpunkt liegen bereits verschiedene Gewebeschichten (äußere, mittlere und innere Schicht) vor, aus denen später die unterschiedlichen Organe hervorgehen. Entwicklungsgeschichtlich geht die Leber aus der inneren Gewebeschicht, dem Endoderm hervor, aus dem u.a. auch der Darm, die Leber, das Pankreas und der Verdauungstrakt entstehen.

Die Entwicklung der Leber wurde anhand von Mausmodellen gut untersucht (Zaret 2002; Duncan 2003) und kann auf die Organogenese beim Menschen übertragen werden. In der Embryonalentwicklung der Maus liegt das Endoderm am Anfang des achten Tages der Entwicklung, oder dem „embryonic day E8.25“ zunächst als einzellige Schicht auf der ventralen Seite des sich entwickelnden Embryos vor. Durch zwei Einstülpungen teilt sich die Schicht in das ventrale und dorsale Endoderm auf, aus dem sich später die verschiedenen endodermalen Gewebe entwickeln (Abb.1.2). Besonders die Nähe zum Herzmesoderm und dem Septum Transversum Mesenchym (STM) ist für die Leberentwicklung entscheidend. Die Expression von FGF-Faktoren (fibroblastic growth factor) aus dem Herzmesenchym und BMP-Faktoren (bone morphogenic protein) aus dem Septum Transversum Mesenchym, bestimmen zunächst das Schicksal der Zellen im ventralen Endoderm.

Später scheinen weitere Faktoren aus dem STM wie HGF (hepatocyte growth factor), cMet (Tyrosinkinase Rezeptor), Smad2+3 (zytoplasmatische Mediatoren des TGF- β -Signalweges) und TGF- β (transforming growth factor β) eine wichtige Rolle zu spielen, da in Mäusen denen diese Gene fehlen die Lebern stark unterentwickelt sind.

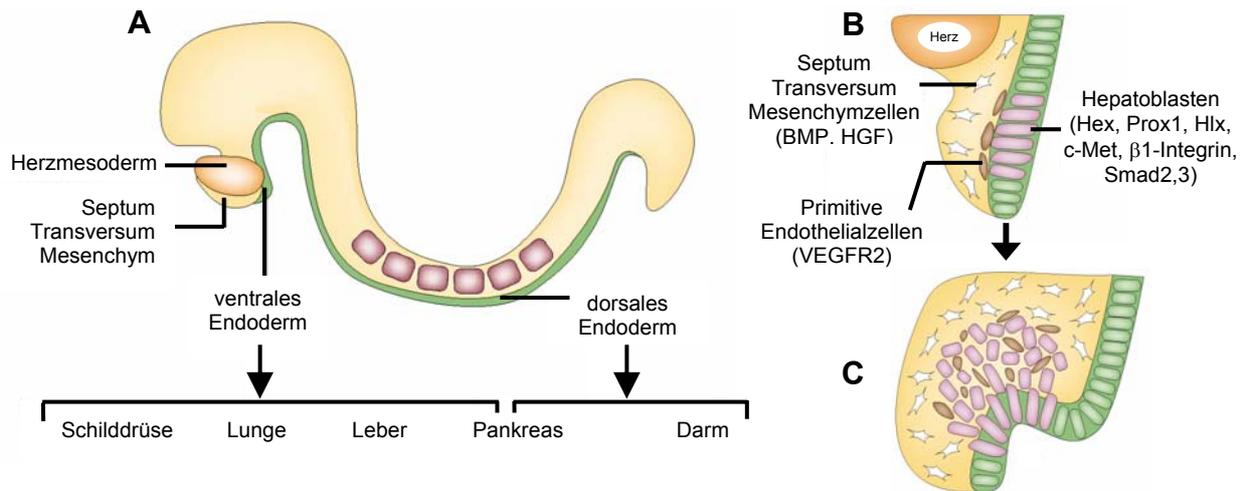


Abbildung 1.2: Entwicklung der Leber (Zaret 2002). Schematische Darstellung der Formierung der unterschiedlichen Endodermsektionen anhand eines Mausembryos im 6-Somiten Stadium **A**, im 11- bis 13- Somiten Stadium, mit Angabe der wichtigsten Transkriptionsfaktoren **B** und im 18- bis 25-Somiten Stadium, mit Einwanderung der Hepatoblasten ins Septum Transversum Mesenchym **C**.

Die Wirkweise von β 1-Integrin (Rezeptorprotein) und Hlx (Homeobox Transkriptionsfaktor) ist noch nicht geklärt, sie scheinen jedoch ebenfalls regulatorisch einzugreifen. Weitere Transkriptionsfaktoren, welche das Schicksal des Endoderms bestimmen, sind zudem verschiedene Faktoren der Gruppe HNF (hepatocyte nuclear factor) und GATA (GATA binding protein), im Besonderen HNF3, HNF4 und GATA4, sowie Hex und Prox1 (Homeobox Transkriptionsfaktoren).

Durch Einwirkung der verschiedenen Faktoren beginnt schließlich die Entwicklung der Leberanlage als Ausknospung des Urdarms vom Tag E8.5 bis E9.5. Die frühen Leberzellen oder Hepatoblasten, wandern in das STM ein (Abb.1.2) und vermischen sich dort mit Endothelzellen, welche zunächst einfache Gefäße ausbilden und später die Sinusoide am „Blutpol“ auskleiden (Abb.1.1). Die Hepatoblasten dagegen differenzieren sich zu Hepatozyten sowie Cholangiozyten und bilden die Ultrastruktur der Leber am „Gallepol“ aus (Zaret 2002 ; Duncan 2003).

1.1.3 Erkrankungen der Leber

Die Leberzirrhose ist die häufigste Erkrankung der Leber, welche durch eine Entzündung (Hepatitis) verursacht wird. Die Entzündung der Leber ist weit verbreitet und kann unterschiedliche auslösende Faktoren wie toxische Substanzen (Alkohol

und Medikamente), Stoffwechselerkrankungen, Verfettung der Leber, Autoimmunerkrankungen, Bakterien oder Viren haben.

Alkoholische Leberzirrhose

Alkohol verursacht in Deutschland die meisten Fälle von Leberzirrhose. Alkohol wird in der Leber zu Fett abgebaut, welches nicht vollständig aus den Zellen entfernt werden kann. Die mit Fett überladenen Zellen entzünden sich nach einer gewissen Zeit und sterben ab. Zusätzlich entstehen beim Abbau von Alkohol Giftstoffe, die weiteres Gewebe zerstören. Wieviel Alkohol zu einem Leberschaden führt, ist von Mensch zu Mensch verschieden. Laut Statistischem Bundesamt (Datenreport 2004) waren in Deutschland im Jahr 2002 17.056 Sterbefälle auf Alkoholkonsum bzw. -missbrauch zurückzuführen. Den weitaus größten Anteil daran hatte hier die „alkoholische Leberzirrhose“ mit 10.031 Toten.

Virusbedingte Hepatitis

Neben Alkohol sind Viren die Hauptursache für eine Zirrhose. Die wichtigsten Hepatitis verursachenden Viren sind die so genannten Hepatitisviren A, B, C, D und E. Neben diesen Viren können aber auch andere Viren wie z. B. Herpesviren und das Gelbfieberevirus eine Hepatitis verursachen.

Die Virusbedingte Leberentzündung ist eine der weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. In Deutschland sind annähernd eine Million Menschen an einer chronischen Virushepatitis erkrankt, die durch Viren B, C und D verursacht wird (Hepatitis A entwickelt keinen chronischen Krankheitsverlauf).

Chronische Virusinfektionen können zu einer dauerhaften Schädigung der Leber führen. Die Hepatozyten sterben ab und Fibroblasten überwuchern das Gewebe. Das Organ ist entzündet und bildet schließlich narbiges Bindegewebe aus. Es entsteht eine Leberzirrhose, durch die das Organ seine Funktionen nicht mehr ausüben kann. Ohne Behandlung kann die Leber schließlich versagen und eine Organtransplantation notwendig machen.

Selbst wenn die Krankheit einen mildereren Verlauf hat, kann durch eine Hepatitis Leberkrebs entstehen, das so genannte Hepatozelluläre Karzinom (HCC).

(www.kompetenznetz-hepatitis.de)

1.2 Das Pankreas

1.2.1 Aufbau und Funktion des Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse oder auch das Pankreas ist aus unregelmäßigen Läppchen aufgebaut und wird in Pankreaskopf, -Körper und -Schwanz unterteilt. Es hat zwei Hauptaufgaben: Der exokrine Teil des Organs produziert Enzyme für die Verdauung, der endokrine Teil produziert Hormone für die Blutzuckerregulierung (Abb.1.3).

Die exokrinen und endokrinen Zellen liegen im Pankreasgewebe nebeneinander vor. Das exokrine Pankreas enthält Drüsenzellen, welche Verdauungsenzyme wie Chymotrypsin (eiweißspaltendes Enzym), Amylase (kohlenhydratspaltendes Enzym) und Lipase (fettspaltendes Enzym) synthetisieren und über ein Gangsystem als inaktive Form an den Darm abgeben. Erst dort werden die Enzyme aktiviert, um eine vorzeitige Verdauung des Pankreasgewebes zu verhindern (Speckmann & Wittkowski, Bau und Funktion des menschlichen Körpers; 20 Aufl. Urban & Fischer).

Im exokrinen Gewebe verstreut liegen die endokrinen Zellen in so genannten Langerhans'schen Inseln vor. Mit einem Anteil von 60-80% der Zellmasse sind die im Zentrum liegenden Insulin-produzierenden β -Zellen Hauptbestandteil der Inseln. Um diese herum liegen die Glukagon produzierenden α -Zellen (15-20%), die Somatostatin produzierenden δ -Zellen (5-10%) und die PP-Zellen, welche pankreatisches Polypeptid (PP) produzieren (<2%) (Edlund 2002).

1.2.2 Entwicklung und Genexpression des Pankreas

Anhand von Mäusen wurde auch die Pankreasentwicklung intensiv untersucht (Huang and Tsai 2000; Soria *et al.* 2000; Edlund 2002), welche analog zur Entwicklung beim Menschen verläuft.

Das Pankreas gehört ebenfalls zum Endoderm und entwickelt sich parallel zur Leber (Abb.1.2). In diesem Fall sind allerdings zwei verschiedene Gewebeabschnitte an der Entwicklung beteiligt. Ein Teil des pankreatischen Endoderms befindet sich wie die Leber in räumliche Nähe zum Herzmesoderm, der andere Teil hat Kontakt zum Notochord. Durch zwei Knospungen des Darmrohres entsteht die Pankreasanlage am Tag E9 im ventralen und dorsalen Endoderm. Beide Teile entwickeln sich zunächst unabhängig voneinander. Erst später fusionieren ventrales und dorsales Pankreas durch eine Drehung des Darms zum eigentlichen, vollständigen Organ.

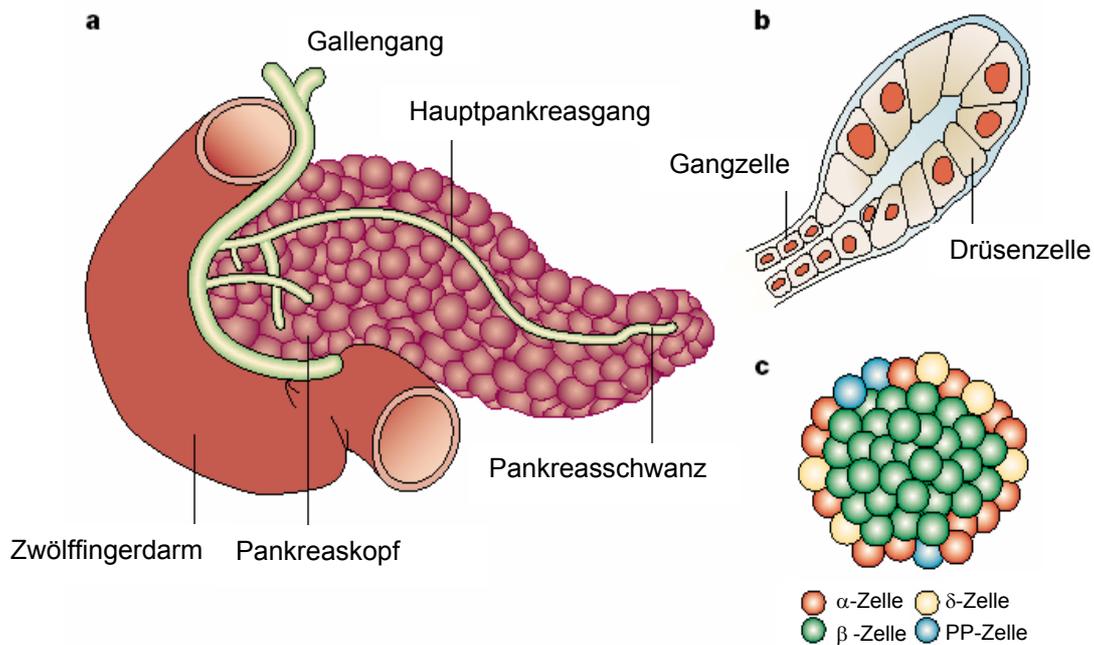


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau des Pankreas (Edlund 2002). Aufbau des adulten Pankreas **A**, des exokrinen Drüsengewebes **B** und einer Langerhans'schen Insel **C**.

Während der Pankreasentwicklung werden eine Reihe wichtiger Gene exprimiert, welche für die Differenzierung des Gewebes in die funktionellen Pankreaszellen sorgen. In der folgenden Übersicht wurden von Bernat Soria (Soria *et al.* 2000) einige wichtige Regulierungsschritte der Genexpression zusammengefasst (Abb.1.4).

Bei der Embryonalentwicklung der Maus hemmt das von der Chorda dorsalis (Notochord) ausgeschüttete Activin das im frühen Endoderm exprimierte Shh (sonic hedgehog). Dies führt wiederum zur Aktivierung von PDX-1 am Tag E8.5, durch welches die Knospung des Pankreas eingeleitet wird. Für die weitere Ausreifung ist die nun folgende Interaktion des umgebenden Mesenchyms mit dem Epithel (Ephiteliomesenchymale Interaktion) zwingend erforderlich (Golosow and Grobstein 1962). Besonders hervorzuheben sind hier die Einwirkungen der Faktorgruppen EGF (epidermal growth factor) und FGF (fibroblastic growth factor), welche für das Wachstum und die Reifung des Pankreas essentiell sind (Bhushan *et al.* 2001; Cras-Meneur *et al.* 2001). Weitere Faktoren, welche auf ähnliche Weise wirken und ebenfalls an diesem Prozess beteiligt zu sein scheinen, sind HGF (hepatocyte growth factor), NGF (nerve growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Edlund 2002).

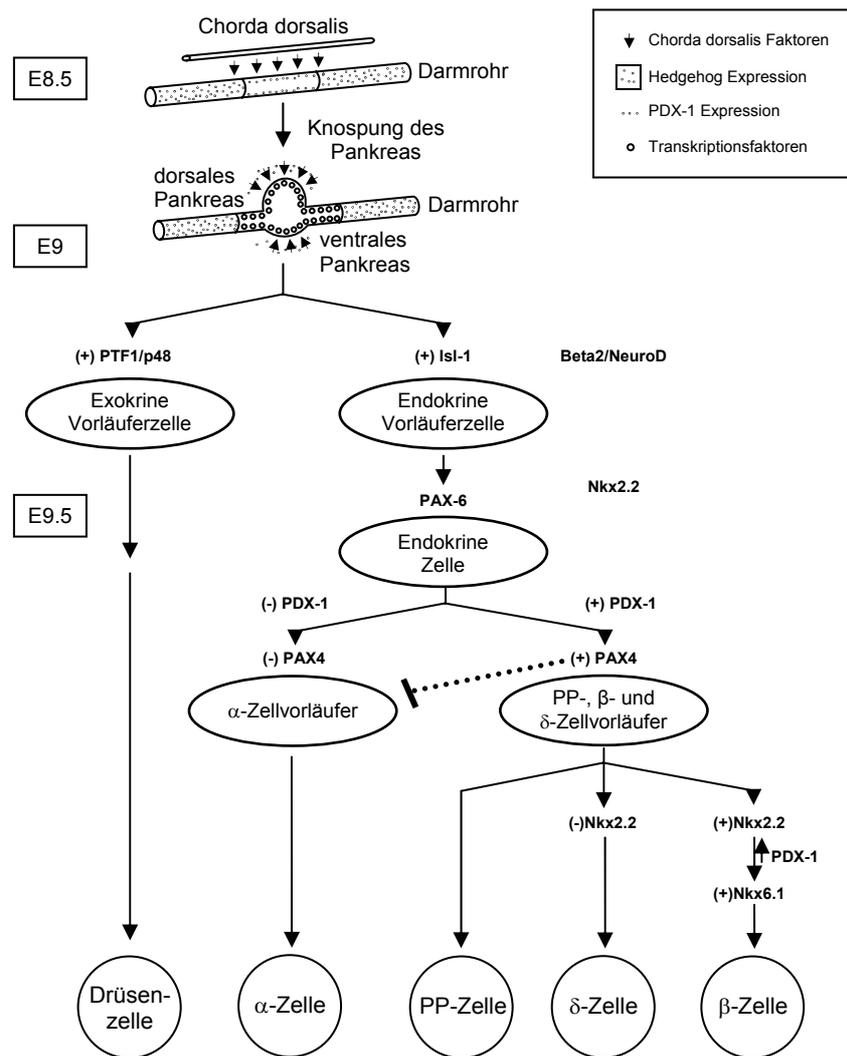


Abbildung 1.4 : Schematische Darstellung der Zellspezialisierung im Pankreas (Soria *et al.* 2000).

Als weiterer wichtiger Mechanismus greift zusätzlich der Notch-Signalweg in die frühe Entwicklung des Pankreas ein. Durch Inaktivierung von Notch wird *ngn3* (*neurogenin3*) hochreguliert, welches die unreifen Vorläuferzellen in endokriner Richtung triggert (Apelqvist *et al.* 1999).

Weitere Faktoren, die in der Differenzierung des Pankreas zu verschiedenen Zeitpunkten eine wichtige Rolle spielen, sind von verschiedenen Autoren (Soria *et al.* 2000; Edlund 2002) zusammengefasst worden und finden sich in Tabelle 1.1 wieder.

Tabelle 1.1: Übersicht einiger regulierender Gene in der Entwicklung des Pankreas.

Gen	Expression embryonales Pankreas	Expression adultes Pankreas	Phänotyp in Nullmutanten
PDX-1 (IPF-1)	am E8-E10 stark exprimiert in Pankreas Vorläuferzellen und später in sich entwickelnden β -Zellen	β -Zellen	das Pankreas fehlt
Hlhx9	am E8-E9 in Pankreas Vorläuferzellen und später in sich entwickelnden β -Zellen exprimiert	β -Zellen	das dorsale Pankreas fehlt; leichte Störungen im ventralen Pankreas
Nkx2.2	am späten E8-E9 in Pankreas Vorläuferzellen exprimiert und später auf endokrine Zellen beschränkt	α -, β - und PP-Zellen	reduzierte Anzahl von α -, β - und PP-Zellen; β -Zellen produzieren kein Insulin
Nkx6.1	von E9-E9.5 in frühen Vorläuferzellen und später in β -Zellen exprimiert	β -Zellen	reduzierte Anzahl von reifen β -Zellen
ISL-1	wird in endokrinen Zellen von Beginn an (~E9) exprimiert und findet sich im dorsalen Mesenchym ab E8-E9	α -, β -, δ - und PP-Zellen	endokrine Zelldifferenzierung gestört; dorsales Pankreasmesenchym fehlt
PAX4	am E9-E9.5 in Pankreas Vorläuferzellen exprimiert	kaum bis gar nicht exprimiert	β - und δ - Zellen fehlen
PAX6	wird in endokrinen Zellen von Beginn an exprimiert	α -, β -, δ - und PP-Zellen	endokrine Zellzahl verringert und verminderte Hormonfreisetzung
NeuroD	ab E9.5 in endokrinen Zellen exprimiert	α -, β -, δ - und PP-Zellen	endokrine Zellzahl verringert und gestörte Polarität der Drüsenzellen
Ngn3	ab E9 in endokrinen Vorläuferzellen exprimiert	nicht exprimiert	endokrine Zellen fehlen und gestörte Polarität der Drüsenzellen
p48	ab ~E9.5 in Pankreas Vorläuferzellen aber später nur noch in exokrinen Zellen exprimiert	exokrine Zellen	exokrines Pankreas fehlt; endokrine Zellen nisten sich in der Milz ein
Mist1	ab ~E13-E14 in sich entwickelnden Drüsenzellen exprimiert	Drüsenzellen	desorganisiertes Drüsen-gewebe, Pankreasläsion mit fortgeschrittenem Alter
HNF1a	im sich entwickelnden Pankreas ab E13.5 exprimiert	β -Zellen, andere unklar	Glukose-abhängige Insulin Ausschüttung beeinträchtigt
HNF3a (FoxA1)	erst im frühen Endoderm später nur in endokrinen Zellen exprimiert	α -, β -, δ - und PP-Zellen	reduzierte pankreatische Glukagon-Genexpression
HNF3b (FoxA2)	im frühen Endoderm, in Vorläuferzellen und allen Pankreaszellen während der Entwicklung exprimiert	alle Pankreaszellen	beeinträchtigt die Bildung des Endoderms
HNF6	ab ~E9 in pankreatischen Vorläufern und allen Pankreaszellen während der Entwicklung exprimiert	alle Pankreaszellen	reduzierte Zahl endokriner Zellen und verzögerte endokrine Zellentwicklung

1.2.3 Erkrankungen des Pankreas

Die Haupterkrankung der Bauchspeicheldrüse ist der Diabetes mellitus. Daneben treten häufig die akute und chronische Pankreatitis (Entzündung der Bauchspeicheldrüse durch eine vorzeitige Wirkung der Verdauungsenzyme) auf. Zudem kann die genetisch erworbene Mukoviszidose (zystische Pankreasfibrose) und der Bauchspeicheldrüsenkrebs vorkommen.

Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM) ist die Bezeichnung für eine Stoffwechselkrankheiten bei der es zu einer Hyperglykämie, also der Überzuckerung des Blutes kommt. Die Ursachen dafür sind entweder ein Insulinmangel, eine Insulinresistenz oder auch beides. Es gibt zwei Diabetes Haupttypen: Den Typ-1-Diabetes bei dem es zu Insulinmangel infolge einer autoimmunologischen Zerstörung der Insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas kommt und den Typ-2-Diabetes mit Insulinmangel durch Insulinresistenz. Typ-2-DM kommt oft im Zusammenhang mit Übergewicht vor. Neben diesen Haupttypen kommt es seltener auch zu speziellen Nebenformen des Diabetes wie Schwangerschaftsdiabetes oder Fehler durch Gendefekte (MODY etc.).

Alleine in Deutschland sind zurzeit mehr als sechs Millionen Diabetiker gemeldet, die tatsächliche Zahl liegt aber vermutlich um einiges höher und wird voraussichtlich bis 2010 sogar zehn Millionen erreicht haben. Weltweit werden bis 2025 bis zu 333 Millionen Diabetiker erwartet.

Mögliche Langzeitfolgen des Diabetes, trotz regelmäßiger Einnahme von Medikamenten oder Insulin, sind z.B. die Schädigung der Blutgefäße mit schweren Netzhautschäden der Augen bis hin zur Erblindung, Störungen der Nierenfunktion bis hin zum Nierenversagen mit Dialyseabhängigkeit, Störung des Fettstoffwechsels bis hin zur Verfettung der Leber und Nervenschäden mit Empfindungsstörungen und zum Teil erheblichen Schmerzen, vor allem in den Beinen.

Diabetische Nervenschäden und Gefäßveränderungen können zu einem so genannten "Diabetischen Fußsyndrom" und schließlich zur Amputation führen. Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen führen zudem zu einem erhöhten Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall.

(www.diabetes.uni-duesseldorf.de, www.ddz.uni-duesseldorf.de)

1.3 Stammzellen

Stammzellen können aus einem Embryo, einem Fötus oder einem „adulten“ Lebewesen nach der Geburt gewonnen werden. Die meisten Arbeiten in diesem Bereich befassen sich mit den Stammzellen von Mäusen, Ratten, Affen und seltener denen des Menschen. Stammzellen sind definiert als Zellen, welche in der Lage sind, sich für einen langen Zeitraum selbst zu regenerieren ohne dabei zu altern und gleichzeitig in verschiedene Körperzellen zu differenzieren.

Kann sich die Stammzelle in ausnahmslos alle Zellen des Organismus differenzieren, so bezeichnet man diese als *totipotent*. Eine solche Zelle ist zum Beispiel die Zygote, welche aus der Vereinigung von Eizelle und Samenzelle entsteht. Aus ihr kann sich ein komplettes Lebewesen entwickeln. Ist es der Stammzelle möglich, sich in alle Körperzellen zu differenzieren, ohne aber einen vollständigen Organismus ausbilden zu können, so ist sie *pluripotent*. Kann sie nur einige selektive Zelltypen generieren, wird sie als *multipotent* bezeichnet (zur Übersicht: NIH stem cell report <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/>).

Die verschiedenen Körperzellen werden in drei Hauptkategorien nach ihrer entwicklungsbiologischen Herkunft eingeteilt. Man gliedert sie in die Gewebeschichten der drei Keimblätter; in Endoderm, Mesoderm und Ektoderm (Abb.1.5) auf.

Das Endoderm (Entoderm) ist das innere Keimblatt des Embryoblasten. Es bilden sich daraus Verdauungstrakt, Leber, Pankreas, Schilddrüse, Thymus, Atmungstrakt, Harnblase und Harnröhre.

Das Mesoderm ist das mittlere Keimblatt, aus diesem entstehen Knochen, Skelettmuskulatur, Teile der Haut, Bindegewebe, glatte Muskulatur, seröse Haut, Herz, Blutgefäße, Blutzellen, Milz, Lymphknoten, Lymphgefäße, Nieren, Nebennierenrinde, Keimdrüsen und das innere Genital.

Das Ektoderm bezeichnet das äußere der drei Keimblätter, hieraus gehen das Zentralnervensystem, die Haut (Cutis), das Nebennierenmark, die Hirnanhangdrüse, das Bindegewebe des Kopfes und des Gesichtes, sowie die Augen und die Ohren hervor.

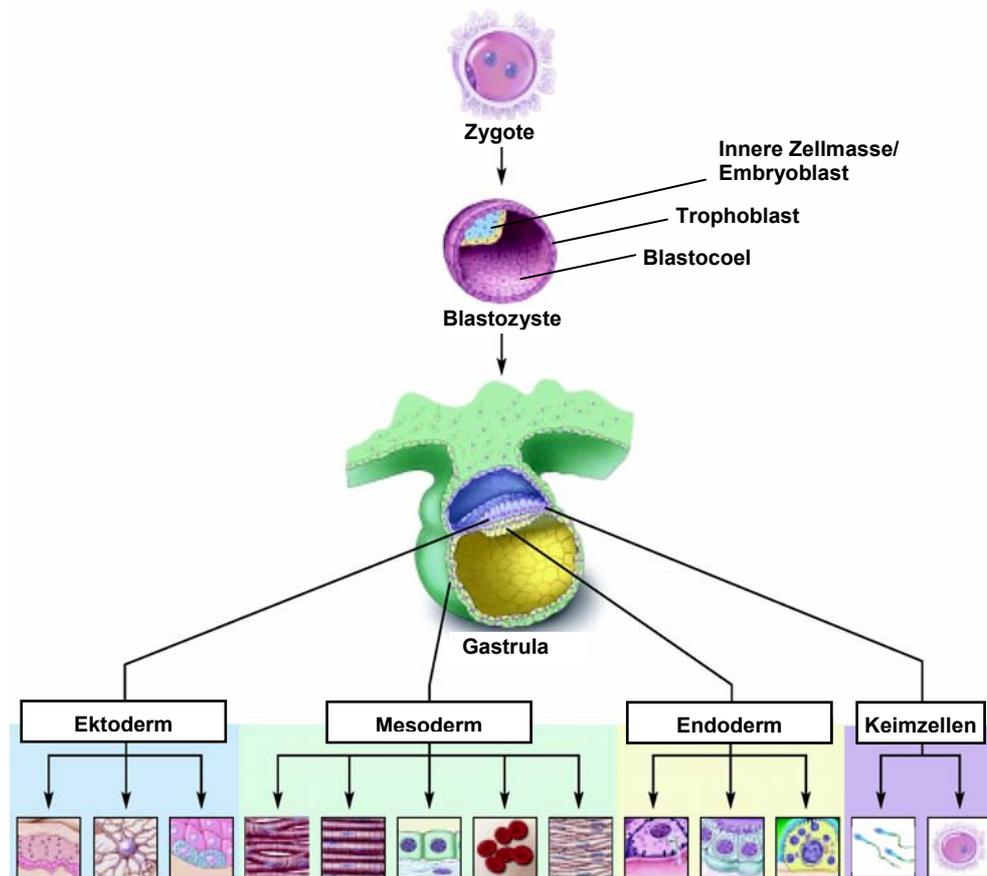


Abbildung 1.5: Differenzierung zu verschiedenen Gewebetypen (aus: NIH stem cell report).

1.3.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen haben pluripotente Eigenschaften und werden wie der Name besagt, aus wenige Tage alten Embryonen gewonnen. Die so genannten ES-Zellen (ESC) werden aus künstlich befruchteten Eizellen im Blastozysten-Stadium entnommen. Die Blastozyste (Keimblase) besteht aus einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblasten, welcher an der Ausbildung der Plazenta beteiligt ist. Er umschließt zudem einen flüssigkeits-gefüllten Hohlraum (Blastocoel) in dessen Inneren die „innere Zellmasse“ liegt. Aus dieser Zellmasse, dem Embryoblasten, entwickelt sich dann später der eigentliche Embryo.

Die Zellen der inneren Zellmasse werden zur Gewinnung der ES-Zellen entnommen, kultiviert, vereinzelt und stellen im Weiteren die embryonalen Stammzellen dar (Thomson *et al.* 1998). Für die *in vitro* Zellkultur werden die embryonalen Stammzellen in speziellem Medium auf einem Zellrasen (Feederlayer) aus Maus-Fibroblastenzellen ausgesät. Die Stammzellen lassen sich über spezielle

„Stammzell-Faktoren“ wie Oct-4, TRA-1-60/81, SSEA3, SSEA4 charakterisieren. Diese bewirken unter anderem, dass sich die Zellen fortwährend teilen und der undifferenzierte Zustand erhalten bleibt. Embryonale Stammzellen können so theoretisch unbegrenzt kultiviert werden, ohne sich zu verändern. In der Praxis jedoch entsprechen einige der älteren, über einen längeren Zeitraum kultivierte Zelllinien nicht mehr dem Originalzustand und weichen von einem normalen Chromosomensatz ab.

Injiziert man ES-Zellen in immuntolerante oder –supprimierte Tiere, so bilden sie Teratokarzinome, welche Zellen aller drei Keimblätter enthalten (Thomson *et al.* 1998). *In vitro* können sich die Zellen ebenfalls in alle drei Gewebetypen entwickeln, wenn sie durch Veränderung der Kulturbedingungen, in so genannte „embryoid bodies“ (EB) umgewandelt werden (Itskovitz-Eldor *et al.* 2000). Über zusätzliche Faktoren oder Veränderungen an den Zellen lässt sich die Differenzierungsrichtung zusätzlich steuern. Die embryonalen Stammzellen sind damit also *in vivo* und *in vitro* pluripotent (Czyz *et al.* 2003).

Des Weiteren finden sich in speziellen malignen Tumoren der Keimbahnzellen ESC-ähnliche Zellen, welche als embryonale Karzinom-Zellen (EC-Zellen, ECC) bezeichnet werden. Obwohl ECC Tumore aus Zellen aller drei Keimblätter bestehen, konnte die Pluripotenz dieser Zellen *in vitro* noch nicht nachgewiesen werden.

Eine weitere Unterart der embryonalen Stammzellen sind die primordiales Keimzellen (embryonic germ cells, EG-Zellen) welche im Fötus die Anlage für die Keimzellen bilden (Shamblott *et al.* 1998). Die EG-Zellen werden aus Aborten gewonnen und sind ebenfalls pluripotent. Im Gegensatz zu ES-Zellen führt die Implantation von EG-Zellen in immunsupprimierte Tiere nicht zur Ausbildung von Teratomen.

In Deutschland ist es nach dem Embryonenschutzgesetz verboten, menschliche embryonale Stammzellen herzustellen. Für die Forschung an diesen Zellen dürfen in Ausnahmefällen nur ES-Zelllinien importiert werden, welche bereits vor dem Jahr 2002 hergestellt wurden.

Endodermale Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Aus embryonalen Stammzellen von Maus, Ratte und Mensch liessen sich embryoid bodies (EB) generieren, die zu einer spontanen Differenzierung in alle Zelltypen fähig waren. Durch Ausplattierung dieser Sphäroide als Monolayer reiften die Zellen weiter

aus. In einer solchen Zellkultur lagen somit Zellen aller Gewebetypen vor, also auch Zellen mit aktiver endodermaler Genexpression in verschiedenen Stadien. Man versuchte in verschiedenen Arbeiten den sehr niedrigen Prozentsatz von nur 0,1% (Czyz *et al.* 2003) der endodermalen Zellen in diesen Kulturen, durch Anreicherungs- und Kultivierungsschritte weiter zu erhöhen. Bei den veröffentlichten Protokollen auf diesem Gebiet wurde die Differenzierung in Richtung Leber häufig durch das Vorhandensein von Albumin, in Richtung Pankreas durch Insulin postuliert. Funktionelle *in vitro* Assays lagen nur selten vor, die differenzierten Zellen wurden jedoch häufig in Tiermodellen eingesetzt. Dabei sollte beachtet werden, dass sich auch undifferenzierte ESC im Tiermodell in alle Zelltypen entwickeln können und diese häufig Teratome bilden (Odorico *et al.* 2001; Chinzei *et al.* 2002). Angaben dazu wurden in den meisten Arbeiten jedoch nicht gemacht.

Bei ES-Zellen aus der Maus konnte durch EB Formierung die spontane Expression einiger frühen und späten endodermaler Gene über Immunhistochemie und RT-PCR nachgewiesen werden, ohne dass zusätzliche differenzierende Agenzien eingesetzt wurden (Miyashita *et al.* 2002). Auch konnte über *Indocyanine green*, ein Farbstoff der von Leberzellen aufgenommen werden kann, die spontane Differenzierung von EB zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden. Durch anschließende RT-PCR und Immunhistochemie der angefärbten EBs konnte ein Anstieg der Albumin und α -1-Antitrypsin Expression beobachtet werden (Yamada *et al.* 2002). Der Einsatz von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie aFGF, HGF und OSM (Hamazaki *et al.* 2001; Kania *et al.* 2004) sollte zusätzliche endodermale Gene aktivieren und die Entwicklungskaskade vorantreiben. Über RT-PCR und Immunhistochemie konnte die Expression von Albumin, α -Fetoprotein und weiteren Lebergenen von einer basalen Expression der EBs innerhalb von einigen Wochen gesteigert werden.

Andere Arbeitsgruppen arbeiteten zunächst mit Überexpression von frühen endodermalen Faktoren wie HNF3 und dann mit unterstützendem Einsatz von speziellen Wachstumsfaktoren. FGF2, Dexamethason, Nikotinamid und Phosphate sollten Maus ES-Zellen zusätzlich in endodermale Richtung triggern. Nach einem und vier Monaten, konnten über RT-PCR einige endodermale Gene nachgewiesen werden (Ishizaka *et al.* 2002). Die Überexpression von PAX4 oder PDX-1 in Maus ESC führte *in vitro* und *in vivo* ebenfalls zu einer Erhöhung der endodermalen

Genexpression. Hier wurden allerdings Gene der pankreatischen Linie aktiviert, so dass die basale Insulin-Sekretion von Maus ES-Zellen gesteigert werden konnte (Blyszczuk *et al.* 2003; Miyazaki *et al.* 2004). Funktionelle Insulin-produzierende murine ES-Zellen wurden zuerst von Bernat Soria beschrieben. Durch spezielle Kultivierung der EB in hoch-Glukose Medium mit Nikotinamid-Zusatz wurden die Zellen in β -Zellen differenziert. Nach einer anschließenden promotorabhängigen Selektion der Insulin-produzierenden EBs, konnten diese Zellen nach der Transplantation in diabetischen Mäusen den Blutzuckerwert normalisieren (Soria *et al.* 2000).

In weiteren Ansätzen wurden Maus ES-Zellen vorselektiert welche positiv für Nestin waren, da im Vorfeld Nestin-exprimierende endodermale Progenitorzellen im Pankreas nachgewiesen werden konnten (Edlund 2002). Durch Nestin-Selektion und Zugabe von bFGF und Nikotinamid wurden aus Maus ESC Spheroide generiert, welche die Hormone der Inselzellen exprimierten, was über Immunohistochemie nachgewiesen wurde. Die Transplantation dieser Zellen in diabetische Mäuse konnte deren Blutzuckerwert jedoch nicht normalisieren (Lumelsky *et al.* 2001). Wie sich später herausstellte, hatten die Zellen Insulin hauptsächlich aus dem Medium aufgenommen und nicht selbst produziert (Rajagopal *et al.* 2003; Hansson *et al.* 2004; Sipione *et al.* 2004). Trotzdem wurde auf diesem Basisprotokoll mit verbesserten Nachweismethoden von verschiedenen Arbeitsgruppen aufgebaut (Hori *et al.* 2002; Blyszczuk *et al.* 2003; Blyszczuk and Wobus 2004; Shi *et al.* 2005). Unter anderem wurden aus diesen vorsortierten, Nestin positiven ES-Zellen mit anschließender Schüttel-Kultur Albumin- und Insulin-exprimierende 3D-Sphären generiert (Kania *et al.* 2003). Die gleiche Arbeitsgruppe erreichte parallel eine Differenzierung der ESC in Hepatozyten-ähnliche Zellen ohne Nestin Selektion, indem nach der spontanen EB-Differenzierung eine gerichtete Faktorstimulierung erfolgte (Kania *et al.* 2004). Der Nachweis wurde hier wieder über RT-PCR und Immunohistochemie erbracht. Durch Behandlung der EBs mit einer einmaligen Dosis Retinolsäure, konnte in Maus ESC nur die Expression einiger früher Gene der Pankreasdifferenzierung wie PDX-1 und HGF über GFP-Expression und RT-PCR nachgewiesen werden. Diese Gruppe postulierte dass die EB nur eine frühe Stufe der Differenzierung erreichen, da keines der späteren Gene wie NeuroD oder Insulin nachgewiesen werden konnte (Micallef *et al.* 2005).

Auch Ratten-ESC wurden durch die Generierung von EBs vordifferenziert und reiften nach Transplantation in läsioniertes Lebergewebe weiter aus. Über die Produktion von Albumin und Bilirubin konnte hier die *in vivo* Funktion der differenzierten ES-Zellen analysiert werden (Tabei *et al.* 2005).

Humane ESC konnten sich ebenfalls durch EB Formierung spontan in endodermaler Richtung differenzieren. Durch RT-PCR und Immunohistochemie konnten 1-3% Insulin-produzierende Zellen in EBs nachgewiesen werden. Die Differenzierung in β -Zellen wurde durch hohe Glucose Konzentrationen im Medium begünstigt (Assady *et al.* 2001). Verschiedene Wachstumsfaktoren unterstützen die endodermale Differenzierung der humanen ESC zusätzlich. Durch Kultivierung von EB mit HGF und NGF konnte nach nur zehn Tagen unter anderem ein Anstieg der endodermalen Genexpression durch RT-PCR nachgewiesen werden. Dabei konnte die basale Expression von Albumin und α -Fetoprotein durch NGF leicht gesteigert werden. Auch konnte hier eine PDX-1 Expression nachgewiesen werden. Durch HGF erhöhte sich die basale Expression von α -1-Antitrypsin und α -Fetoprotein. Albumin oder PDX-1 wurden hier nicht exprimiert (Schuldiner *et al.* 2000). Durch Zugabe von Natriumbutyrat, welches ähnlich wie Retinolsäure Apoptose induziert, konnten ES-Zellen aus dem Menschen ebenfalls endodermal differenziert werden. Die Zellen exprimierten verschiedene späte Leber-spezifische Gene und waren negativ für α -Fetoprotein (Rambhatla *et al.* 2003).

In den meisten Arbeiten hängt die *in vitro* Differenzierung der verschiedenen ES-Zellen hauptsächlich von der spontanen Differenzierung ab. Die etablierten Protokolle führten kaum zu einer funktionellen Ausreifung der Zellen. Zwar konnte in vielen Experimenten Albumin oder Insulin nachgewiesen werden, allerdings wurde die Expression von Genen anderer Gewebetypen parallel nicht untersucht. Die Arbeit von Schuldiner und Kollegen (Schuldiner *et al.* 2000) in der die Genexpression von ausgewählten Markern aller drei Keimblätter untersucht wurden zeigt deutlich, dass in einer Zellpopulation neben den endodermalen ebenso mesodermale und ektodermale Gene aktiv sind.

1.3.2 Adulte Stammzellen

Ebenso wie die embryonale wird die adulte oder somatische Stammzelle über die Fähigkeit charakterisiert, sich über lange Zeit selbst zu erneuern und sich in andere funktionelle Körperzellen zu differenzieren, ohne zu altern. Auf dem Weg zur ausdifferenzierten Zelle werden verschiedene Zwischenstufen, so genannte Vorläufer- oder Progenitorstadien durchlaufen.

Die erste und seit vielen Jahren bekannte adulte Stammzelle, ist die hämatopoietische Stammzelle oder HSC (Lewis and Trobaugh 1964). Heute weiß man von adulten Stammzellen in vielen Geweben, wie zum Beispiel Knochenmark, peripherem Blut, Nabelschnurblut, Gehirn, Rückenmark, Zahnwurzel, Skelettmuskel, Haut, Darm, Cornea, Retina, Leber und Pankreas.

Die adulte Stammzelle befindet sich in den jeweiligen Organen, um dort abgestorbene Zellen zu erneuern. Manche Gewebe haben eine hohe Zellerneuerungsrate, wie zum Beispiel die Haut, während andere Gewebe, wie das Gehirn, im erwachsenen Menschen nur sehr wenige neue Zellen ausbilden. Unter Umständen können die Stammzellen lange Zeit ruhen und beginnen erst nach Stimulation (z.B. durch eine Verletzung), neue Zellen zu produzieren.

Die Stammzellen im Gewebe sind selten. Man schätzt, dass auf 10.000-15.000 Knochenmarkszellen nur eine einzige hämatopoietische Stammzelle kommt, im peripheren Blut ist es sogar nur eine unter 100.000 Zellen.

Entwickelt sich die Stammzelle in Gewebetypen, die von denen in ihrem ursprünglichen Organ vorkommenden abweichen, so spricht man von der Plastizität der Zelle oder auch von Transdifferenzierung. Man geht davon aus, dass die Zellen im Menschen eine solche Entwicklung unter normalen Umständen nicht durchlaufen, jedoch kann es bei einigen Krankheiten zur Transdifferenzierung kommen (Shen *et al.* 2003; Li *et al.* 2005). Auch im Labor konnte festgestellt werden, dass viele adulte Stammzellen dieses intrinsische Potential besitzen. In den letzten Jahren ist immer deutlicher geworden, dass die anfänglich als kaum potent bezeichnete adulte Stammzelle offensichtlich doch pluripotente Eigenschaften besitzt. Für einige Zellen konnte die Pluripotenz bereits nachgewiesen werden indem die adulten Stammzellen teils *in vivo*, teils *in vitro* in verschiedenen Gewebetypen der drei Keimblätter differenziert werden konnten (Czyz *et al.* 2003; Blyszczuk and Wobus 2004).

1.3.2.1 Hämatopoietische Stammzellen (HSC)

Hämatopoietische Stammzellen (HSC) werden aus dem Knochenmark, aus dem peripheren Blut von zuvor stimulierten Spendern (Apherese), oder aus Nabelschnurblut gewonnen und sind für die Bildung aller Blutzellen zuständig. HSC sind seit langem bekannt und werden vor allem zur Behandlung von Erkrankungen des blutbildenden Systems eingesetzt. Es sind zwei Typen von Zellen bekannt, die das Blutsystem wieder aufbauen: die „long-term stem cells“ und die „short-term progenitor cells“. Beide Zelltypen sind kaum zu unterscheiden. Während die long-term Zellen tatsächliche Stammzellen sind, die sich einerseits als Stammzelle selbst erneuern und andererseits differenzierte Blutzellen hervorbringen können, sind die Progenitor Zellen zwar in der Lage, sich schnell in Blutzellen zu verwandeln, bleiben dabei aber nicht selbst erhalten. HSC konnten bereits in Blutzellen *in vitro*, Herzmuskelzellen, Skelletmuskelzellen, Epithelzellen, Cholangiozyten und Hepatozyten *in vivo* differenziert werden (Masson *et al.* 2004). Unter den HSC befinden sich auch die erst kürzlich entdeckten Zellen der „side population“ (Goodell *et al.* 1996), welche sich durch einen bestimmten Farbstoff von den HSC im Durchflußzytometer unterscheiden lassen.

Endodermale Differenzierung von HSC

Aus Knochenmark aufgereinigte murine HSC wurden in bestrahlte und leberdefiziente Empfängermäuse injiziert. Die Tiere litten aufgrund eines Gendefektes an Hypertyrosinämie, welche unbehandelt tödlich verläuft. Sechs Monate post-OP konnten die transplantierten Zellen der Spendermäuse durch eine LacZ-Färbung in vier Empfängertieren nachgewiesen werden. Die transplantierten Zellen machten dabei einen Anteil von 30-50% der Zellen in der Leber aus und die behandelten Tiere hatten im Gegensatz zu den unbehandelten, annähernd normale Blutwerte (Lagasse *et al.* 2000).

Auch HSC aus humanem Nabelschnurblut wurden für Transplantationen in NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) Mäuse eingesetzt (Ishikawa *et al.* 2003). Hier sollten die humanen Zellen die Leber der Maus repopulieren um Analysen von menschlichen Leberzellen im Tiermodell zu ermöglichen. Die humanen Zellen wanderten nach der Transplantation in die Leber ein und produzierten dort Albumin und den human-spezifischen Leber-Marker HepPar1. Der Nachweis erfolgte über RT-PCR, sowie über Immunohistochemie.

Die Gruppe um Diane Krause postulierte sogar, dass schon eine einzelne isolierte HSC durch Transplantation in bestrahlte Mäuse zu Epithelzellen verschiedener Gewebe führen kann (Krause *et al.* 2001). Unter anderem konnten Cholangiocyten mittels Immunohistochemie in der Leber der Empfängermäuse nachgewiesen werden, jedoch keine Hepatozyten. Diese Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Wagers *et al.* 2002). Obwohl die Repopulierung der Leber durch hämatopoietische Stammzellen offensichtlich nur sehr selten vorkommt, konnten diese auch in Knochenmark-transplantierten Patienten nachgewiesen werden (Alison *et al.* 2000; Theise *et al.* 2000; Korbling *et al.* 2002). Immunohistochemische Analysen verschiedener Leberbiopsien von Frauen, denen Knochenmark von männlichen Spendern transplantiert worden war, wiesen bis zu 7% Hepatozyten mit einem männlichen Chromosomensatz auf. Bei diesem Phänomen scheint es sich aber hauptsächlich um Zellfusionen oder um phagozytierte Zelltrümmer zu handeln (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Vassilopoulos *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003).

Almeida-Porada und Kollegen gelang es im *in utero* Schaf Modell, bei dem es sich um ein entwicklungsbiologisches und kein Schädigungsmodell handelt, einen sehr hohen Prozentsatz von humanen Spenderzellen im Lebergewebe der Schafe nachzuweisen. Fötalen Schafen wurden Zellen intraperitoneal injiziert, die die Tiere aufgrund ihrer immunologischen Unreife nicht abstoßen konnten. Die Zellen entwickelten sich somit parallel zu den Schafzellen. Dabei differenzierten sich HSC aus Knochenmark zu 5-10% und HSC aus Nabelschnurblut sogar zu 15-20% zu Hepatozyten in der Schafleber. Der Nachweis erfolgte über Immunohistochemie von humanem Albumin und einem human-spezifischen Hepatozyten Antikörper (Almeida-Porada *et al.* 2004). In diesen Experimenten gab es keine Hinweise auf eine Fusion der hämatopoietischen Zellen mit den Hepatozyten der Schafleber.

In einer *in vitro* Cokultur mit geschädigtem Lebergewebe konnten HSC ebenfalls in Hepatozyten-ähnliche Zellen differenziert werden (Jang *et al.* 2004). Das Gewebe für dieses Experiment wurde aus Mäusen gewonnen, denen 24h zuvor eine Läsion der Leber über toxische Substanzen oder Hepatektomie zugefügt worden war. Das geschädigte Gewebe wurde im Anschluss, über eine Membran getrennt, mit HSC *in vitro* kokultiviert. Parallel wurden HSC in die geschädigten Mäuse transplantiert. Über RT-PCR und Immunohistochemie mit chromosomaler Analyse konnte die Differenzierung der HSC in Hepatozyten-ähnliche Zellen *in vivo* und *in vitro* über die

Expression von verschiedenen leberspezifischen Genen nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Cokultur mit zuvor nicht geschädigtem Lebergewebe keine endodermale Differenzierung.

Neben der Cokultivierung von HSC mit Lebergewebe führte auch die *in vitro* Kultivierung von humanen HSC mit bestimmten Faktoren zu einer Differenzierung der Zellen in endodermaler Richtung. Auf Collagen I Beschichtung und in speziellem Medium mit HGF-Zusatz, zeigten die hämatopoietischen Stammzellen nach vier Wochen eine Expression von Cytokeratin 19 und Albumin, die durch RT-PCR nachgewiesen werden konnte. (Fiegel *et al.* 2003).

Experimente zur Differenzierung von HSC in Pankreaszellen wurden kaum veröffentlicht. Ein Protokoll beschrieb jedoch die Verbesserung des Insulinstoffwechsels durch Transplantation von HSC in NOD-Mäusen (Kang *et al.* 2005). Wurden die Stammzellen vor Ausbruch der Diabetes in die Mäuse transplantiert, so wurde die Krankheit für ein Jahr verzögert. Die Tiere, denen erst nach dem Ausbruch HSC transplantiert wurden, zeigten keine Verbesserung der Symptome.

1.3.2.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC), die ebenfalls aus dem Knochenmark isoliert werden können, wurden bereits 1968 erstmalig beschrieben (Friedenstein *et al.* 1968). Im Gegensatz zur HSC trägt die MSC jedoch keine hämatopoietischen Zellantigene wie CD45 oder CD34 und kann als fibroblastoide Zelle adhärent kultiviert werden. Diese Zellpopulation besitzt ein pluripotentes Differenzierungspotential und kann in Zellen der Leber, des Pankreas, der Nieren, der Lunge, der Haut, des Verdauungstrakt, des Herzens, der Skelettmuskeln und des Nervengewebes differenziert werden (Le Blanc and Pittenger 2005).

Im Knochenmark finden sich neben den hämatopoietischen Stammzellen und den MSC noch *stromale* Knochenmarkszellen, welche für die natürliche Zellumgebung oder „Nische“ der HSC sorgen und selbst Vorläufer von Knochen-, Knorpel- und Fettzellen im Knochenmark sind. Es ist bisher nicht klar, ob diese Zellpopulation als Stammzelle oder Vorläuferzelle charakterisiert werden kann.

Endodermale Differenzierung von MSC

Lee und Kollegen entwickelten ein *in vitro* Differenzierungsprotokoll bei dem mit Hilfe von Oncostatin M und HGF mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in Hepatozyten-ähnliche Zellen differenziert werden konnten (Lee *et al.* 2004). Nach Vorbehandlung der Zellen mit bFGF und EGF folgte für zwei Wochen eine Kultivierung in Differenzierungsmedium mit HGF Zusatz und für weitere zwei Wochen in Reifungsmedium mit OSM. Die differenzierten MSC wiesen nach dieser Zeit eine Hepatozyten-ähnliche Morphologie auf und exprimierten verschiedene leberspezifische Marker, welche über RT-PCR und Immunohistochemie nachgewiesen werden konnten. Zudem speicherten die Zellen Glykogen, was über eine Periodic-Acid-Schiff Färbung gezeigt wurde und nahmen LDL (low density lipoprotein) auf, eine spezifische Funktion der Leber im Cholesterin-Stoffwechsel.

Das Protokoll wurde später in modifizierter Form auch für MSC aus Nabelschnurblut angewandt (Hong *et al.* 2005). Hier entfiel jedoch die Vorinkubation. Die Differenzierung in Richtung Leber wurde anhand von RT-PCR, Immunohistochemie und Western-Blot Analyse überprüft. Als funktioneller Assay wurde zusätzlich die LDL-Aufnahme der generierten Zellen überprüft.

Ein für MAPC (siehe 1.3.2.3) entwickeltes Protokoll mit extrazellulären Matrixfaktoren, FGF-4 und HGF (Schwartz *et al.* 2002) konnte ebenfalls auf MSC angewendet werden (Kang *et al.* 2005). In diesem Fall wurde die Differenzierung der Zellen über die Proteinkonzentration von α -Fetoprotein und Albumin im Medium überprüft. Nach drei Wochen konnte in der faktorinduzierten Kultur α -Fetoprotein nachgewiesen werden. Die Konzentration von α -Fetoprotein nahm anschließend mit zunehmender Albumin- und Harnstoff-Konzentration im Medium ab. Auch konnte die Speicherung von Glykogen nachgewiesen werden.

Die Cokultur von eGFP-markierten Ratten MSC mit frisch isolierten Leberzellen und Wachstumsfaktoren, führte zur Expression von Lebermarkern in FACS-sortierten (fluorescence activated cell sorting) eGFP-Zellen (enhanced green fluorescent protein) (Lange *et al.* 2005). Durch die Cokultivierung der MSC auf Fibronectin-Beschichtung mit frischen Hepatozyten und in Gegenwart der Faktoren SCF, HGF, EGF und FGF4 exprimierten die Zellen verschiedene endodermale Marker. Durch RT-PCR konnten die Cytokeratine 18 und 19, Albumin und α -Fetoprotein nachgewiesen werden.

Eine Differenzierung in pankreatische Zellen wurde *in vitro* mit Ratten MSC durch Kultur mit bestimmten Faktoren erreicht (Chen *et al.* 2004). Hier wurde zunächst für 24h ein Medium mit einer niedrigen Glukose-Konzentration, Serum Zusatz, sowie Nikotinamid und β -Mercaptoethanol eingesetzt. Dann folgte eine weitere zehnstündige Inkubation der Zellen mit den gleichen Faktoren in einem serumfreien Medium mit einer hohen Glukose Konzentration. Nach dieser kurzen Zeitspanne war in der RT-PCR das Ratten-Insulin-1 Gen in den Zellen erhöht. Außerdem wurde Insulin über einen Sekretionsassay im Medium nachgewiesen, sowie Insulin- und Nestin-positive Zellen über Immunohistochemie angefärbt. Andere Faktoren wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Überexpression von verschiedenen frühen endodermalen Genen wie PDX-1, HLXB9 oder Foxa2 (HNF3b) mit zusätzlicher Kokultur von Inselzellen, führte in humanen MSC zur Differenzierung in Richtung Pankreas (Moriscot *et al.* 2005). Über RT-PCR konnte in den mit PDX-1 transfizierten Zellen, eine leichte Erhöhung der Expression von PAX4, ISL-1 und Insulin nachgewiesen werden, in den mit HLXB9 und HNF3b transfizierten Zellen waren NeuroD und Insulin erhöht. Die Expression anderer pankreatischer Gene wie Nkx2.2 und PAX6 fiel jedoch negativ aus.

1.3.2.3 Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC)

Eine weitere Population von Knochenmarkstammzellen, welche aus kultivierten MSC unter bestimmten Bedingungen hervorgehen kann, wird als multipotente adulte Progenitorzelle (MAPC) bezeichnet. Die Gruppe um Catherine Verfaillie hat diese spezielle Zelle ursprünglich aus dem Knochenmark von Mäusen, Ratten und Menschen isoliert und differenziert. MAPCs konnten bislang *in vitro* in Osteoblasten, Chondroblasten, Skelettmuskelzellen, Adipozyten, Hepatozyten-ähnliche Zellen und neuronale Zellen differenziert werden und wurden *in vivo* im hämatopoietischen System, dem Verdauungstrakt, der Lunge und der Leber von Mäusen gefunden.

Neben dem Knochenmark konnten MAPCs in Mäusen auch aus Muskelgewebe und dem Gehirn isoliert werden. Ob die Stammzellen dort ebenfalls vorliegen, oder ob es sich um zirkulierende Zellen des Knochenmarks handelt, konnte noch nicht nachgewiesen werden (Verfaillie *et al.* 2003; Verfaillie 2005).

Endodermale Differenzierung von MAPC

In vitro wurden MAPCs aus Maus, Ratte und Mensch auf einer Matrigel-Matrix ausplattiert und mit den Faktoren FGF4 und HGF in Hepatozyten-ähnliche Zellen differenziert (Schwartz *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2002). Nach sieben bis 21 Tagen wurde die Änderung der Genexpression mittels RT-PCR verfolgt. Hier konnte zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Expression HNF3b, GATA4, α -Feto, HNF1, Albumin und Cytokeratin 18 in den verschiedenen Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Zellen mittels Westernblot, Immunohistochemie und funktionelle Assays analysiert. Murine MAPC wurden zudem in bestrahlte und unbestrahlte NOD/SCID Tiere transplantiert und konnten nach vier bis 24 Wochen unter anderem in der Leber gefunden werden (Jiang *et al.* 2002). Der Nachweis von endodermal-differenzierten Zellen erfolgte durch Immunhistochemische Analyse von Albumin und Cytokeratin18.

1.3.2.4 Unselektionierte mononukleäre Zellen (MNC)

Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark enthalten kernhaltige Zellen, aus denen durch spezielle Selektion oder Kultivierung HSC, MSC oder MAPC isoliert werden können. In vielen *in vivo* Versuchen wurde jedoch die heterogene Population der mononukleären Zellen gänzlich unselektiert eingesetzt. Auf welche Zellen die Veränderungen im Modell zurückzuführen sind, ist in den meisten Fällen nicht geklärt.

Am Menschen wird bereits eine Therapie eingesetzt, bei der Herzinfarktpatienten eigene MNC aus dem Knochenmark in den Herzmuskel injiziert werden. Die Narbenbildung, eine Folge des Infarktes wird verringert und die Leistung des Herzens wird verbessert (Strauer *et al.* 2005).

Endodermale Differenzierung von MNC

Der erste Versuch MNC aus Knochenmark (BMMNC) *in vivo* in Leberzellen zu differenzieren gelang Petersen und Kollegen (Petersen *et al.* 1999). In dieser Arbeit wurden die Versuchstiere mit einem Toxin behandelt, welches die Proliferation der eigenen Leberzellen hemmte und so die Aktivierung der ovalen Leberstammzelle bewirkte. Anschließend wurden die Tiere bestrahlt und unseparierte MNC injiziert. Differenzierte Spender-Zellen konnten über Immunohistochemie von CD26 mit einem niedrigen Prozentsatz von <0,15% in der Leber der Empfänger nachgewiesen

werden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte durch Injektion von männlichen BMMNC in bestrahlte weibliche Mäuse, endodermal-differenzierte Donorzellen in der Leber nachweisen (Theise *et al.* 2000). In diesem Modell ohne zusätzliche Leberschädigung wurden eine Woche bis zwei Monaten nach der Transplantation 2,2% der Spender-Zellen über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der mRNA des Y-Chromosoms mit paralleler Albumin-Expression nachgewiesen.

Die *in vivo* Differenzierung von BMMNC in Pankreaszellen wurde in zwei besonderen Mausmodellen untersucht (Ianus *et al.* 2003). Zum einen wurden MNC transplantiert, die genetisch so verändert waren, dass diese eGFP (enhanced green fluorescent protein) exprimierten und grün fluoreszierten, wenn Insulin in den Zellen aktiv transkribiert wurde. Damit konnte aufgrund der Fluoreszenz eine endodermale Differenzierung der MNC nachgewiesen werden. Diese eGFP-positiven Zellen betrug 1,7-3% der gesamten β -Zellen und exprimierten neben Insulin zusätzlich die Gene PDX-1 und HNF3b was über Immunohistochemie detektiert wurde. In einem zweiten Ansatz wurde über das Cre-Lox System untersucht, ob diese Differenzierung auf Fusion der MNC mit Pankreaszellen zurückzuführen war. In diesem Modell wurden INS2-Cre Spenderzellen in einen ROSA-stoplox-eGFP Empfänger implantiert. Bei diesem Modell wurde nur bei Fusion von beiden genetisch veränderten Zelltypen eGFP exprimiert. Da in diesem Fall keine eGFP-Expression nachgewiesen werden konnte, erfolgte die endodermale Expression der MNC nicht aufgrund von Fusion.

Eine andere Arbeitsgruppe implantierte BMMNC in bestrahlte und Streptozocin-behandelte, diabetische Mäuse. Hier konnten neue β -Zellen nachgewiesen werden, welche allerdings nicht auf die Donor-MNC, sondern auf die Eigenregeneration des Gewebes zurückzuführen war (Hess *et al.* 2003). Die Autoren postulierten, dass die Stammzellen, die sich in diesem Fall in vaskuläre Endothelzellen differenzierten, möglicherweise Faktoren sezernierten, welche die Eigenregeneration des Gewebes bewirkten.

Auch aus Nabelschnurblut isolierte MNC wurden in NOD/SCID Mäuse implantiert. Ein und zwei Monate nach Transplantation wurden im Pankreas der Tiere humane Insulin-produzierende Zellen mit einem Anteil von 0,65% nachgewiesen (Yoshida *et al.* 2005). Humane Zellen wurden über FISH, Insulin-Expression über Immunohistochemie und RT-PCR analysiert.

1.3.2.5 Unrestringierte somatische Stammzellen (USSC)

Die „unrestringierte somatische Stammzelle“ (USSC) aus dem Nabelschnurblut ist eine so genannte neonatale Stammzelle und wurde im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätskliniken der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nachgewiesen und beschrieben (Kogler *et al.* 2004). Die Zelle wird durch spezielle Kultivierung der mononukleären Zellfraktion des Nabelschnurblutes gewonnen, behält bis in die 20. Passage ihre pluripotenten Eigenschaften und weist ein normales Karyogramm auf. Die USSC exprimiert keine hämatopoietischen Antigene wie CD45 oder CD34 und die Telomere sind wesentlich länger als die der mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark der gleichen Passage. Damit stellt die USSC vermutlich eine Vorläuferzelle der MSC dar (Kogler *et al.* 2004). Des Weiteren unterscheiden sich USSC und MSC unter anderem im Differenzierungsspektrum, dem unterschiedlichen Immunophänotyp und einem veränderten mRNA Expressionsmuster.

USSC zeigen ein breites Differenzierungspotential in ektodermale, mesodermale und endodermale Richtung (Abb.1.6). *In vitro* konnte die USSC in Osteoblasten (Knochenvorläuferzellen), Chondroblasten (Knorpelvorläuferzellen) und Adipozyten (Fettzellen) differenziert werden. In einem Tiermodell konnte zudem die Knochen und Knorpelbildung durch USSC *in vivo* beobachtet werden (Jager *et al.* 2004; Kogler *et al.* 2004). Die USSC konnte *in vitro* und *in vivo* in neuronale Zellen, Oligodendrozyten und Astrozyten differenziert werden. Im *in utero* Schafmodell (Flake *et al.* 1986; Zanjani *et al.* 1996), wurde die Fähigkeit der USSC sich in hämatopoietische Zellen, Herzzellen (Purkinjezellen und Kardiomyozyten) und Hepatozyten zu differenzieren, nachgewiesen (Kogler *et al.* 2004). Die Applikation der USSC in einem präklinischen Herzinfarkt-Modell am Schwein, resultierte in einer Integration in den Herzmuskel und einer Verbesserung der Herzfunktion (Kim *et al.* 2005).

Endodermale Differenzierung von USSC

Vorergebnisse zeigten bereits, dass nach *in utero* Transplantation der USSC in das präimmune Schaf-Modell, Zellen in die Leber migrierten und sich parallel zu Leberparenchymzellen des Schafes entwickelten. Immunohistochemische Analysen der Schafleber, einige Monate nach der Geburt der Tiere, ergaben einen hohen Anteil (20%) an Zellen, die positiv für humanes Albumin (Abb.1.6) und den humanspezifischen Hepatozyten-Antikörper waren (Kogler *et al.* 2004); weitere

endodermale Gewebe wurden zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht.

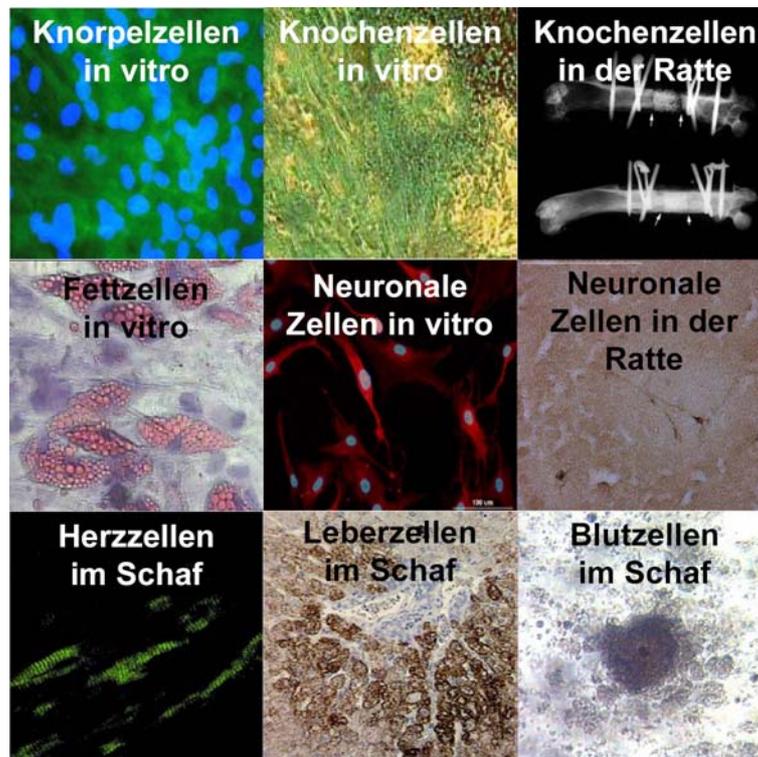


Abbildung 1.6: Differenzierungspotential der USSC aus: Kogler *et al.* 2004.

1.3.2.6 Stammzellen in Leber- und Pankreasgewebe

Obwohl die Leber ein hohes Regenerationspotential hat und sich die Hepatozyten häufig teilen, kann bei manchen Erkrankungen der Zellersatz durch frühere Zellen erforderlich sein. Die Stammzellen der Leber werden als „hepatic progenitor cells“ (HPC) oder ovale Zellen (oval cells/OC) bezeichnet und liegen vermutlich in den Hering Kanälchen vor. Isolation und Kultivierung der Zellen gelang bisher nur für ovale Zellen aus Ratten (He *et al.* 2004) und Mäusen (Wang *et al.* 2003) und nur über einen begrenzten Zeitraum. Die OC aus Mäusen ließen sich nach Isolation aus Lebergewebe *in vitro* in Hepatozyten und Cholangiozyten differenzieren und repopulierten in einem murinen *in vivo* Modell die geschädigte Leber. Humane ovale Zellen dagegen konnten bisher nur anhand von Biopsien analysiert werden. Durch spezielle Erkrankungen der Leber wurden die Stammzellen in diesen Fällen aktiviert und konnten im Gewebe über Immunohistochemie nachgewiesen werden (Libbrecht and Roskams 2002).

Leberstammzellen konnten auch durch spezielle Antigenerkennung im Durchflußzytometer aus fötaler Mausleber isolierten werden (Suzuki *et al.* 2002). Zellen mit der

Antigen-Kombination cMet⁺ / CD49f^{+/low} / c-Kit⁻ / CD45⁻ / TER119⁻ wurden für sechs Monate in Kultur gehalten, in der die isolierten Zellen Hepatozyten und Cholangiozyten produzierten, aber selbst als Albumin und Cytokeratin19 negative Zellen erhalten blieben.

Für die Erneuerung der pankreatischen β -Zellen wurde ebenfalls die Zellteilung der funktionellen Inselzellen postuliert (Dor *et al.* 2004). In diesem System wurde erneut mit dem Cre/Lox-System gearbeitet. Residente adulte β -Zellen waren in einem Mausmodell genetisch so verändert, so dass diese über bestimmte Immunohistochemie Färbung nachgewiesen werden konnten. Aus diesen Zellen hervorgehende Tochterzellen waren in der Immunohistochemie ebenfalls positiv. Im Gewebe vorliegende Stammzellen jedoch trugen keine aktive Veränderung. Aus diesen Zellen differenzierte β -Zellen wurden über Immunohistochemie nicht angefärbt. Nach partieller Pankreatektomie wurde untersucht, ob die neu gebildeten β -Zellen in der Immunohistochemie positiv waren. In diesem Versuch wurden alle neu gebildeten Zellen angefärbt und gingen aus bereits vorhandenen Insel-Zellen hervor.

Verschiedene andere Arbeitsgruppen gingen in ihren Arbeiten jedoch davon aus, dass für die Zellerneuerung unterschiedliche Pankreas-Stammzellen verantwortlich sind. Hier wurden unter anderem spezielle Inselzellen, Gangzellen oder die ovale Leberstammzelle vorgeschlagen (Bonner-Weir and Sharma 2002; Abraham *et al.* 2004; Bonner-Weir and Weir 2005).

Bonner-Weir und Kollegen konnten zeigen, dass aus exokrinem Gewebe von Inselzelltransplantationen, Insulin-produzierende Zellen *in vitro* generiert werden konnten (Bonner-Weir *et al.* 2000). Diese Gangzellen wurden als adhärenter Monolayer kultiviert und mit Matrigel überschichtet. Durch diese Manipulation bildeten sich 3D-Strukturen, aus welchen sich im Folgenden Insel Zell-ähnliche Cluster ausbildeten. Diese neuen Zellen sezernierten Insulin, welches im Medium mit ansteigender Konzentration gemessen werden konnte. Die Zellen waren zudem in der Immunohistochemie für Insulin und PDX-1 positiv.

Im Jahr 2001 berichtete Zulewski von einer Nestin-positiven Zellpopulation im Pankreas von Ratte und Mensch, welche keinen der typischen α -, β -, δ - und PP-Zell Faktoren exprimiert und sich *in vitro* bis zu acht Monaten kultivieren und expandieren ließ. Bei zu hoher Konfluenz begannen diese Zellen Pankreas- und

leberspezifische Marker zu präsentieren, welche durch Kultivierung mit speziellen Faktoren wie Aktivin-A, Nikotinamid und HGF verstärkt werden konnten (Zulewski *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den von Zulewski gefunden Zellen wurden von einer anderen Arbeitsgruppe so genannte „small cells“ als Vorläuferzellen in Mensch und Hund postuliert. Diese Zellen waren negativ für Nestin, exprimierten aber alle Faktoren der vier endodermalen Zelltypen (Petrovavlovskaja and Rosenberg 2002). Diese Zellen teilten sich in Kultur nicht und sezernierten Glucose-abhängig Insulin.

Vorläufer aus Maus-pankreatischen Insel- und Gangzellen wurden in serumfreien, neuronalem Stammzellmedium unter Zusatz von FGF und EGF kultiviert. Die Zellen wiesen unterschiedliche Nestin-Expression auf und differenzierten sich durch Kultivierung in die verschiedenen Inselzellen sowie in neuronale Zellen (Seaberg *et al.* 2004). PDX-1 und Insulin konnten über Immunohistochemie nachgewiesen werden, andere pankreatische Gene wurden zusätzlich über RT-PCR detektiert. Auch wurden Zellen mit exokrinen Pankreas-Markern wie Glukagon und Amylase mittels Immunohistochemie gefunden.

Zellen aus exokrinem Gewebe von Ratten und Menschen wurden mit spezieller Kultivierung nach dem Protokoll zur Generierung von embryoid bodys aus ESC zu so genannten *organoid bodys* (OB) umgewandelt. In diesen Sphären kam es zur spontanen Differenzierung der Zellen die Genmarker aller drei Keimblätter aufwiesen (Kruse *et al.* 2004). Differenzierte endodermale Zellen waren Immunohistochemie-positiv für Insulin.

Verschiedene Arbeiten beschäftigen sich zudem mit der Transdifferenzierung von Pankreas in Leberzellen, um Zellen des einen Gewebes zur Regeneration des Anderen zu nutzen. So konnten isolierte ovale Zellen der Leber *in vitro* und *in vivo* durch den Einsatz von hoch-Glukose Medium in Zellen mit Expression verschiedener Pankreasmarker differenziert werden (Yang *et al.* 2002). Pankreaszellen wurden wiederum *in vivo* in geschädigtes Lebergewebe transplantiert und konnte in Zellen der Leber umgewandelt werden (Dabeva *et al.* 1997; Wang *et al.* 2001). Auch durch spezielle andere Faktoren konnten die Zelltypen ineinander überführt werden (z.B. durch Kupfer oder FGF7; Dexamethason). Selbst beim Menschen wurde *in vivo* eine spontane Transdifferenzierung von Pankreas und Leberzellen bei bestimmten Krankheitsbildern beobachtet (Shen *et al.* 2003; Li *et al.* 2005). Durch den parallelen entwicklungsbiologischen Ursprung beider Gewebe ist die Signaltransduktion in Leber und Pankreas ähnlich.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die unrestringierte somatische Stammzelle aus dem Nabelschnurblut in endodermale Richtung zu differenzieren. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Differenzierung der Stammzellen in Insulin-produzierenden Zellen des Pankreas (β -Zellen) und in Hepatozytenzellen der Leber.

Beide Zelltypen können durch verschiedene Krankheiten zerstört werden (1.1.3 und 1.2.3), was eine langwierige und kostenintensive Therapie erfordert. Vielen Patienten kann dabei auf Dauer nur mit einer Organtransplantation das Leben gerettet werden. Leider stehen nur sehr wenige Spenderorgane einer Vielzahl von Patienten gegenüber. Während bei einer Lebertransplantation die Möglichkeit besteht, ein Teilorgan von einem lebenden Spender zu verpflanzen, kann das Pankreas nur von verstorbenen Spendern als ganzes Organ, oder als isolierte Inselzellen (Edmonton-Protokoll) übertragen werden. Bei Eurotransplant (www.eurotransplant.nl) sind alle Patienten der Mitgliedsländer Deutschland, Österreich, den Niederlanden, Belgien, Luxemburg und Slowenien registriert, die auf eine Niere, Leber, Herz, Lunge oder Pankreas warten. Derzeit sind dies insgesamt etwa 16.000 Menschen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Ansatz, geschädigtes Gewebe in Zukunft nicht mehr über eine Transplantation von Spenderorganen ersetzen zu müssen, sondern einen Zellersatz durch Stammzellen zur Verfügung zu stellen. Aus USSC sollten funktionelle Leber- und Pankreaszellen für die Transplantation generiert werden, um das bisherige Verfahren der Organtransplantation zu ersetzen. Eine solche Therapie mit differenzierten Stammzellen kann möglicherweise viel früher in den Krankheitsverlauf eingreifen. Der Transplantation als letzten Alternative gehen in den meisten Fällen jahrelange ärztliche Behandlungen und Medikationen voraus. Könnte man bereits zu Beginn einer Krankheit Stammzellen einsetzen, bliebe den Patienten der lange Leidensweg womöglich erspart.

Nabelschnurblut liegt bereits heute in Nabelschnurblutbanken in großen Mengen kryokonserviert als Transplantat vor und kann über eine Typisierung der Gewebemerkmale (HLA, human leukocyte antigen) verschiedenen Empfängern zugeordnet werden. Da Nabelschnurblut unlimitiert vorliegt, als Abfallprodukt ethisch unbedenklich aufgearbeitet werden kann und praktisch keine Krankheitserreger enthält, stellt es die ideale Quelle für Stammzellen dar. Zudem kann es aufgrund seiner immunologischen Unreife auch ohne exakte Übereinstimmung der Gewebemerkmale transplantiert werden (Kogler *et al.* 1999).

Material & Methoden



2.1 Generierung der USSC

Das verwendete Nabelschnurrestblut stammte aus 30 kooperierenden Frauenkliniken der Region und wurde dort für die José Carreras Stammzellbank Düsseldorf entnommen. Mit dem Einverständnis der Mutter wurde das Restblut nach der Versorgung des Kindes von geschulten Hebammen aus der Nabelschnurvene gewonnen (Kogler *et al.* 1996). Für die Verwendung des Blutes als allogenes hämatopoietisches Stammzell-Transplantat wurden sehr strenge Richtlinien der Bundesärztekammer festgelegt. Wurden diese Anforderungen nicht erfüllt, konnte das Blut für die Forschung eingesetzt werden.

2.1.1 Aufarbeitung des Nabelschnurblutes

USSC können bislang noch nicht direkt aus dem Nabelschnurblut isoliert werden, da kein spezifisches USSC-Antigen bekannt ist. Daher wird die Fraktion der mononukleären Zellen (MNC) isoliert und kultiviert, unter denen sich auch die USSC befindet. Bei ca. 40% der Proben konnten so USSC Kolonien aus den MNC Kulturen generiert werden:

Bei der Aufarbeitung des Nabelschnurblutes wurde zunächst das Volumen bestimmt und ein Aliquot zur Messung der Zellzahl abgenommen (Celldyn 3500, Abbott). Zur Aufreinigung der mononukleären Zellfraktion wurden 15ml Ficoll (Biochrom) in ein

50ml Röhrrchen vorgelegt, vorsichtig mit Blut überschichtet und zentrifugiert (20min/20°C/850rcf; ohne Bremse). Nach der Zentrifugation lagen die mononukleären Zellen auf dem Ficollgradienten auf und konnten mit Hilfe einer sterilen Pipette abgenommen werden. Plasma, Ficoll, Erythrozyten und Granulozyten wurden verworfen. Die MNC wurden anschließend in Phosphat gepufferter Saline (PBS/Serag-Wiessner) gewaschen und zentrifugiert (10min/4°C/750rcf), der Überstand wurde verworfen.

Trotz des Ficollgradienten enthielt das Pellet noch einige Erythrozyten, welche im Anschluss durch alkalische Lyse entfernt wurden. Zu diesem Zweck wurde das Pellet in 25ml Ammoniumchlorid resuspendiert (8,3g NH₄Cl+1,0g KHCO₃+0,0375g EDTA-Na₂ ad. H₂O dest. 1L; hergestellt und sterilisiert in der Apotheke der Universitätsklinik Düsseldorf), für 5-10min bei 4°C inkubiert und dann zentrifugiert (7min/4°C/550rcf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Die aufgereinigten Zellen wurden nun noch zweimal mit 50ml PBS gewaschen und zentrifugiert (7min/4°C/550rcf), um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen. Nach dem Verwerfen des Überstandes und resuspendieren des Pellets in 50ml PBS wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Aus der Anzahl der verbliebenen weißen Blutzellen konnte nun berechnet werden, in welchem Volumen des Kulturmediums die Zellen nach der Aufreinigung aufgenommen werden sollten.

Für die Zellkultur zur Gewinnung der USSCs wurden pro Milliliter Kulturmedium zwischen 5×10^6 und 1×10^7 mononukleäre Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurde dem Medium Dexamethason (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 1×10^{-7} M/ml zugesetzt. Zur Generierung der USSC wurden anfänglich zwei Medien verwendet: zum einen Myelocult H5100 (StemCell Technologies) mit L-Glutamin (2mM, Cambrex), Penicillin (100U/ml, Cambrex) und Streptomycin (100µg/ml, Cambrex); zum anderen „Dulbecco's modified Eagle's medium“ DMEM (low glucose, Cambrex) mit 30% fötalem Kälber Serum (FCS, zertifizierte Charge) mit L-Glutamin (2mM, Cambrex), Penicillin (100U/ml, Cambrex) und Streptomycin (100µg/ml, Cambrex). Verschiedene Seren mussten zuvor eine strenge Qualitätskontrolle durchlaufen, da nicht jede Charge für die Generierung und Kultivierung der USSC geeignet war.

Die Zellen wurden anschließend in den jeweiligen Medien auf 25cm² oder 75cm² Plastik-Zellkulturflaschen (Costar/Corning) ausplattiert und im Inkubator kultiviert (37°C / 5%CO₂ / 100% Luftfeuchte). Das Medium wurde wöchentlich gewechselt und so lange mit Dexamethason versetzt, bis sich adhärente USSC-Kolonien bildeten.

Danach wurde nur noch Zellkulturmedium ohne Dexamethason zugesetzt. Hatten sich nach vier Wochen noch keine Kolonien gebildet, so wurden die Kulturen verworfen.

2.1.2 Passagieren der Zellen

Die adhärent wachsenden USSC teilten sich alle 2-3 Tage und mussten bei 80%iger Konfluenz passagiert werden. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS abgespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1xTrypsin (0,25% Cambrex, verdünnt mit PBS) überschichtet und für 5-10min bei 37°C inkubiert. Leichte Schläge mit der flachen Hand gegen die Flasche lösten fester verankerte Zellen ab. Durch Zugabe von FCS oder humanem Serum Albumin (HSA) wurde das Trypsin in der Zellsuspension nach Vereinzelung der Zellen abgesättigt (Endkonzentration = 2% Protein). Die USSC wurden anschließend mit PBS gewaschen, zentrifugiert (7min/4°C/550rcf) und mit einem Faktor von 1:3 in frischem Zellkulturmedium neu ausplattiert.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung der USSC wurde eine Trypan-Blau Färbung in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden 10µl Zellsuspension mit 10µl Trypan-Blau (0,4% Sigma) versetzt, auf die Kammer gegeben und 62 Kästchen, bzw. vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet: Gesamtzellzahl = (ermittelte Zellzahl / 4) x 2 x 10⁴ x ml.

Die ermittelte Zahl wurde zunächst durch vier geteilt um den Mittelwert pro Großquadrat zu ermitteln. Diese mittlere Zellzahl wurde anschließend mit dem Faktor zwei multipliziert, da die Zellsuspension durch Trypan-Blau 1:1 verdünnt wurde. Das Ganze wurde dann mit dem Faktor 10⁴ multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Für die Gesamtzellzahl wurde das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

2.1.4 Kryokonservierung der Zellen

USSC konnten für einen längeren Zeitraum bei -196°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Passagieren (siehe 2.1.2) nicht wieder ausplattiert, sondern gezählt (siehe 2.1.3) und anschließend eingefroren. Die durchschnittliche Zellzahl pro Aliquot (1ml Zellsuspension) betrug

$1-3 \times 10^6$ Zellen. Es konnten auch höhere Zellkonzentrationen (bis 1×10^7 Z/ml) eingefroren werden, jedoch eignen sich kleinere Aliquots besser zur späteren Weiterverarbeitung. Um die Zellen durch den Konservierungsprozess nicht zu zerstören, mussten sie zunächst in verdünntem FCS aufgenommen werden und wurden dann in einer Dimethylsulfoxid Lösung (DMSO/CryoSure WAK-Chemie) eingefroren. Das Zellpellet wurde dazu in 4°C kaltem, 80% FCS (80% FCS + 20% RPMI 1640 Medium ICN, sterilfiltriert) gelöst. Das Volumen richtete sich dabei nach der gewünschten Zellzahl pro Aliquot. Zu den Zellen in FCS wurde anschließend zügig die gleiche Menge 4°C kaltes, 20%iges DMSO (20% DMSO + 80% RPMI 1640 Medium, sterilfiltriert) getropft, resuspendiert und je 1ml auf die Kryo-Röhrchen (2ml, Greiner) verteilt. Die Röhrchen wurden in einer RT-warmen Kryobox langsam ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) auf zunächst -80°C abgekühlt und konnten nach 24h in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.1.5 Auftauen der Zellen

Das Kryo-Röhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurde sofort nach der Entnahme aus dem Stickstofftank im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis sich darin noch ein kleiner Eiskristall befand. Die Zellsuspension wurde in 2ml 50% FCS (50% FCS + 50% RPMI 1640) überführt und für 30s inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 15% FCS gewaschen und zentrifugiert (7min/ 4°C /550rcf). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet rückgelöst und die Zellen in der gewünschten Menge Medium zur weiteren Kultivierung aufgenommen. Zur Messung der Vitalität konnten die Zellen mit Trypan-Blau gezählt werden (2.1.3).

2.2 Charakterisierung der USSC

2.2.1 Immunphänotypische Markierung und Durchflußzytometrie

Zur Analyse der Zellantigene wurde im Durchflußzytometer eine Antikörperbindung durch Fluoreszenz gemessen. Dazu mussten die Zellen nach dem Passagieren (2.1.2) zunächst gezählt werden (2.1.3) und nach dem Pelletieren auf eine Konzentration von mindestens 1×10^6 Z/ml mit PBS+0,5%HSA eingestellt werden. Pro Messung wurden 100 μl Zellsuspension benötigt. Die Messungen wurden mit einem EPICS XL-MCL (Beckman-Coulter, Krefeld) Durchflußzytometer durchgeführt.

Färbung mit direkt konjugierten Antikörpern

Für die Messung konnten zwei verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe gleichzeitig zur Markierung benutzt werden, die es ermöglichen, zwei verschiedene Antikörper (AK) parallel zu messen (Tab.2.1). Zum einen FITC = Fluoreszeinisothiocyanat (grün) und zum anderen PE = Phycoerythrin (rot). Die vom Hersteller empfohlene, oder vorher titrierte Menge, des gewünschten Antikörpers wurde mit den Zellen für 15min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze zur Minimierung des Hintergrundes mit PBS gewaschen und zentrifugiert (7min/4°C/550rcf). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellsediment in einigen Tropfen PBS resuspendiert und konnte anschließend im Durchflußzytometer gemessen werden.

Färbung mit nicht konjugierten Antikörpern

Nicht alle Antikörper sind direkt-konjugiert erhältlich. Diesen unkonjugierten Antikörpern fehlt ein Fluorochrom, oder ein anderes gekoppeltes Molekül, das den Nachweis des AK möglich macht. Daher setzt man einen zweiten, konjugierten Antikörper ein, der gegen den ersten gerichtet ist. Die Bindung des unkonjugierten AK an das Zellantigen erfolgte wie oben beschrieben. Als zweit-Antikörper wurde ein FITC- oder PE-konjugierter F(ab')₂ Ziege-anti-Maus IgG+IgM Antikörper eingesetzt und nochmals für 15min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze noch einmal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (7min/4°C/550rcf), in PBS resuspendiert und anschließend im Durchflußzytometer gemessen.

Intrazytoplasmatischer Nachweis

Für den intrazytoplasmatischen Nachweis von Antigenen mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden. Hierzu wurde das Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) eingesetzt und die Zellen entsprechend den Angaben des Herstellers markiert.

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper

<i>FITC konjugierte Antikörper</i>	
Immunotech	CD4 (13B8.2), CD8 (B9.11), CD11a (25.3.1), CD14 (RMO52), CD15 (80h5), CD31 (5.6E), CD33 (D3HL60), CD34 (581), CD44 (J-173), CD62L (DREG56), CD80 (MAB104), CD90 (F15.42), CD71 (YDJ122), HLA I - ABC (B9.12.1), F(ab') ₂ goat anti mouse IgM/IgG, IgG1 (679.1Mc7), IgG2a (U7.27)
BD Biosciences	CD45 (2D1), CD49b (AK7), CD86 (FUN-1), CD40 (5C3)
Serotec	CD62E/P (1.2B6)
Caltag	CD105 (SN6)
R&D	CD106 (BBIG-V3)

<i>PE konjugierte Antikörper</i>	
Immunotech	CD11b (BEAR1), CD16 (3G8), CD25 (B1.49.9), CD29 (K20), CD38 (T16), CD49e (SAM1), CD50 (HP2/19), CD54 (84H10), CD56 (NKH-1), CD117 (95C3), IgG1 (679.1Mc7), IgG2a (U7.27)
Pharmingen	Glycophorin A (GA-R2)
BD Biosciences	CD10 (HI10a), CD13 (L138), CD49d (L25.3), CD49f (GoH3), CD73 (AD2), CD123 (9F5), CD166 (3A6), HLA II-DR (G46-6)
Miltenyi Biotech	CD133/1 (AC133), CD133/2 (AC141)
<i>unkonjugierte Antikörper</i>	
Immunotech	CD58 (AICD58), IgG1(679.1Mc7), IgG2a (U7.27), IgM (GC323)
Santa Cruz	FLK-1 / KDR (A-3), cytokeratin 8 (C51), cytokeratin 18 (DC-10), Vimentin (V9)
R&D	CD44H (2C5)
Chemicon	human endo (P1H12)
Dianova	Goat anti rat Cy2, normal rat IgG

2.2.2 Statistische Auswertung

Der statistischen Auswertung der Daten lag der durch Welsh korrigierte studentische T-Test zu Grunde.

2.3 Nachweis der Genexpression

Die Änderung der Genexpression wurde über die Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen. Untersucht wurden mehrere Gene die in endodermalen Geweben zu frühen und zu späteren Zeitpunkten exprimiert werden.

2.3.1 RNA Isolation

Zur Isolation der RNA aus den USSC wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Der im Kit enthaltene RLT-Puffer wurde mit β -Mercaptoethanol (10 μ l auf 1ml Puffer) versetzt und zur Lyse der Zellen eingesetzt. Die zu untersuchenden USSC wurden entweder trypsinisiert (2.1.2) und dann lysiert, mit einem Zellschaber (Greiner) abgekratzt und lysiert oder mit PBS gewaschen und direkt in der Zellkulturschale lysiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach Vorschrift des Herstellers über die mitgelieferten Silica-Membranen. Ein DNase-Verdau wurde normalerweise nicht durchgeführt, da alle Primer so etabliert wurden, dass sie nur RNA und keine DNA binden konnten.

Lediglich für die Aufreinigung der Transfektionen war es nötig, die cDNA vollständig zu entfernen. Während der RNA-Aufreinigung konnte zu diesem Zweck ein DNase-Verdau auf der Säule nach Angaben des Herstellers zwischengeschaltet werden. (RNase free DNase Set, Qiagen).

2.3.2 RT-PCR

Die RT-PCR wurde in einem zweigeteilten Verfahren durchgeführt: Zunächst wurde in einer RT-Reaktion die mRNA mit dem Omniscript Kit (Qiagen), RNasin (Promega) (Tab.2.2) und den spezifischen RT-Primern (Tab.2.3) in cDNA umgeschrieben (1h / 50°C). Dabei wurden pro Reaktion bis zu 8 RT-Primer gleichzeitig eingesetzt. Anschließend wurden die cDNAs über das Taq-DNA Polymerase Kit (Qiagen) amplifiziert (Tab.2.2). Der RT-Ansatz wurde dazu in bis zu 8 Aliquots (je nachdem, wie viele RT-Primer benutzt wurden) aufgeteilt, mit den zugehörigen 3' und 5'-PCR Primern (Tab.2.3) und den nicht im Kit enthaltenen dNTPs (Boehringer/Roche) zum Mastermix zugegeben. Die DNA wurde initial 2min bei 94°C denaturiert, danach folgten 35 Zyklen: 30s denaturieren bei 94°C, 30s hybridisieren bei 60°C, 1min verlängern bei 72°C. Zum Abschluss wurde nochmals für 4min bei 72°C verlängert, die PCR konnte danach einige Zeit bei 4°C gelagert werden. Beide Reaktionen wurden in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt

Tabelle 2.2: RT und PCR Reaktionsansätze.

	Komponente	pro Reaktion	Endkonzentration
RT-Reaktion	RNasin 40U/μl 1:4 mit H ₂ O verdünnten	1μl	10 U
	RT-Primer Mix (8 Primer je 20 pmol/μl)	1,5μl	3,75 pmol pro Primer
	dNTP Mix	2μl	0.5 mM pro dNTP
	10x RT Puffer	2μl	1x
	Omniscript 4U/μl	1μl	4U
	RNA	200-1000ng	
	RNase freies H ₂ O	ad 20 μl	
PCR-Reaktion	3'-Primer	1 μl	20 pmol
	5'-Primer	1 μl	20 pmol
	c-DNA	1/8 der RT-Reaktion	
	10x PCR Puffer	2,5 μl	1x
	5 x Q-Solution	5 μl	1x
	dNTP Mix	1,5 μl	0,2 mM pro dNTP
	Taq-Polymerase 5U/μl	0,125 μl	0,625 U
	H ₂ O	ad 25 μl	

Tabelle 2.3: Verwendete Primer.

Gen	Primer	Sequenz	Bp	TM
α -Fetoprotein (213 bp)	5'	5'-GTA CGG ACA TTC AGA CTG CT-3'	20	60
	3'	5'-ATT GTA GGT GCA TAC AGG AAG-3'	20	60
	RT	5'-TGT TGA TTT AAC AAG CTG C-3'	19	52
	Hyb	5'-TAC ATG AGC ACT GTT GCA GA-3'	20	58
Albumin (420 bp)	5'	5'- ATC CTG ATT ACT CTG TCG TG-3'	20	60
	3'	5'- TGC AGC ATT TGG TGA CTC TG-3'	20	60
	RT	5'- TCA ACA AGT GCA GTT TGT T -3'	19	52
	Hyb	5'- AGA CTA TCT ATC CGT GGT CC -3'	20	60
CYP2B6 (320 bp)	5'	5'- GTA TTC GGC CAG CTG TTT GA - 3'	20	60
	3'	5'- GGG TAT TTG AGC ATG AGC AG - 3'	20	60
	RT	5'- AGA CTC TCT CTG CAA CAT - 3'	18	52
	Hyb	5'- TCA TCG ACA CCT ACC TGC TC - 3'	20	62
Cyp3A4 (291 bp)	5'	5'- AGT GTT CTC TCC TTC ATT ATG T-3'	22	60
	3'	5'- CCA GTA CTT TGG GTC ACG G-3'	19	60
	RT	5'-CTT GCT GAA TCT TTC AGG -3'	18	52
	Hyb	5'- ACC CAA TAA GGC ACC ACC CA -3'	20	62
GAPDH (755 bp)	5'	5'-TCA AGA TCA TCA GCA ATG CCT-3'	21	60
	3'	5'-GAT GGT ACA TGA CAA GGT GC-3'	20	60
	RT	5'- TTG AGC ACA GGG TAC TTT -3'	18	52
	Hyb	5'- TGG AAG GAC TCA TGA CCA CA -3'	20	60
GATA4 (472 bp)	5'	5'- ACG GGT CAC TAT CTG TGC AA -3'	20	60
	3'	5'- ACA TCG CAC TGA CTG AGA AC -3'	20	60
	RT	5'-CGC ATA GCC TTG TGG G -3'	16	52
	Hyb	5'- AGA CAC CAG CAG CTC CTT CA -3'	20	62
GYS2 (285 bp)	5'	5'- GTTAT ACTCCAGCTG AATGCA - 3'	21	60
	3'	5'- CAT GCT GGT AAT ATC TGC CTA - 3'	21	60
	RT	5'- CCTACTGCTT ACGGTATTTA - 3'	20	60
	Hyb	5'- AAC AGC TGT GGG ATG TTG CA - 3'	20	60
HNF1 (538 bp)	5'	5'- AAG CCA AGC TGG TCT CAG C -3'	19	60
	3'	5'- GAG GTG AAG ACC TGC TTG G -3'	19	60
	RT	5'- GCT GGA GGA CAC TGT G -3'	16	52
	Hyb	5'- TGA CAG CAC TGC ACA GCT TG-3'	20	62
HNF3b (343 bp)	5'	5'- AGA GCC CGA GGG CTA CTC -3'	18	60
	3'	5'- GCT CAT GGA GTT CAT GTT GG -3'	20	60
	RT-	5'- CGA GAT GTA CGA GTA GG -3'	17	52
	Hyb	5'- CCA TGA ACA TGT CGT CGT AC -3'	20	60
HNF4a (466 bp)	5'	5'- TAC TCC TGC AGA TTT AGC CG -3'	20	60
	3'	5'- GTC ATT GCC TAG GAG CAG C-3'	19	60
	RT	5'- CTC GTC AAG GAT GCG TA -3'	17	52
	Hyb	5'- TCA AGC TAT GAG GAC AGC AG -3'	20	60
Insulin (236 bp)	5'	5'- CAT CAG AAG AGG CCA TCA AG - 3'	20	60
	3'	5'- CCT GCC CCA CCT GCA GGT -3'	18	60
	RT	5'- CTG CAG GCT GCC TGC A -3'	16	54
	Hyb	5'- TCA CAC CTG GTG GAA GCT CT -3'	20	62
ISL-1 (431 bp)	5'	5'- CCA TCT CCG CCA GGC AGC -3'	18	62
	3'	5'- CAG GCT GAT CTA TGT CAC TC -3'	20	60

	RT	5'- AAT TGA CCA GTT GCT GAA A -3'	19	52
	Hyb	5'- CTG AAC GAG AAG CAG CTG CA -3'	20	62
NeuroD (454 bp)	5'	5'- GAC TAT CAC TGC TCA GGA C -3'	19	68
	3'	5'- GCT TCT GCG TCT TAG AAT AGC -3'	21	62
	RT	5'- CTG AAC GAA GGA GAC CA -3'	17	52
	Hyb	5'- ACG AAG ATG AGG ACC TGG AA -3'	20	60
Nkx6.1 (406 bp)	5'	5'-CAC ACG GCA TCA ACA ATA TCC-3'	21	62
	3'	5'- AAC AAA ATG GAT CCT TGA TGA G-3'	21	60
	RT	5'- AAC CAG ACC TTG ACC tG -3'	17	52
	Hyb	5'- GGA CTG CCA CGC TTT AGC AG -3'	20	64
PAX4 (304 bp)	5'	5'-CAG TGT CTC CTC CAT CAA CC- 3'	20	62
	3'	5'- GTT GGA AAA CCA GAC CCT C-3'	19	58
	RT-	5'-GAA GCA CCT GGC AGC T-3'	16	52
	Hyb	5'-CAT AGT GGC TCT GAG ACT CC-3'	20	62
PDX-1 (217 bp)	5'	5'- GGA TGG GTC TAC CAA AGC TC-3'	20	62
	3'	5'-CAG ATC TTG ATG TGT CTC TCG-3'	21	62
	RT	5'-CCT GCT CAG GCT CCG-3'	15	52
	Hyb	5'-CCT ACG CTG CGG AGC CGG AG-3'	20	70
eGFP (427 bp)	5'	5'- CTG AAG TTC ATC TGC ACC AC -3'	20	60
	3'	5'- GTG TTC TGC TGG TAG TGG TC -3'	20	62
	RT	5'- TCA CGA ACT CCA GCA G-3'	16	50

2.3.3 Southern Blot und Hybridisierung

Bei der Etablierung neuer Primer wurde in der RT-PCR nicht nur auf die richtige Fragmentgröße geachtet. Es wurde zudem überprüft ob die richtigen Sequenzen amplifiziert worden sind, indem die cDNA mit einem vierten, biotinylierten Primer (Tab.2.3) hybridisiert wurde.

Dazu wurden die RT-PCR Produkte auf einem 2%igen Agarose Gel (2.3.4) aufgetragen und das Gel nach der Auftrennung für 30min in 0,4 normaler Natronlauge (NaOH) eingelegt. Eine auf die Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran (GeneScreen plus, Pall/NEN Life Science Products) wurde zunächst in H₂O dest. eingeweicht und dann ebenfalls für 15min in NaOH inkubiert. Das

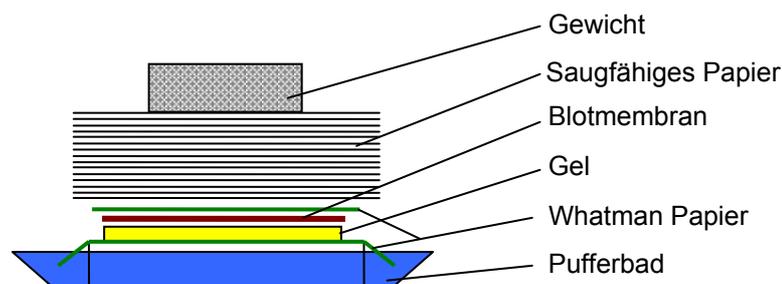


Abbildung 2.1: Aufbau des Kapillarblots für den Southern Blot

Pufferbad wurde mit 0,4 normaler Natronlauge befüllt und das Whatman Papier darin äquilibriert. Wie in Abbildung 2.1 beschrieben, wurden die verschiedenen Komponenten übereinander geschichtet und über Nacht geblottet. Danach wurde die Membran mit der übertragenen DNA 5min in 0,5% (w/v) heißer Sodiumdodecyl-Lösung (SDS) geschüttelt, anschließend zusammengerollt (DNA Seite innen) und in ein Falcon Tube überführt. Für 10min wurden die Membranen bei 42°C mit 10ml Hybridisierungspuffer (Tab.2.4) im rotierenden Hybridisierungssofen inkubiert. Danach wurde 150pmol des biotinylierten Hybridisierungsprimers zugegeben und die DNA mit den Primern für weitere 60min bei 42°C hybridisiert. Im Anschluss wurde die Lösung verworfen und das Röhrchen einmal kurz mit Puffer A gespült und mit weiteren 10 ml Puffer A für 10min bei 42°C gewaschen. Anschließend wurde für 20min mit 15ml TMACI bei 62°C inkubiert. Durch diesen Schritt blieben nur die spezifischen Bindungen erhalten, die unspezifischen lösten sich wieder ab. Danach wurde nochmals für 20min mit 15ml TMACI bei 62°C hybridisiert und die Lösung später verworfen, TMACI wurde als Sonderabfall gesammelt.

Die Membranen wurden aus den Röhrchen genommen, in einer Wanne erst kurz mit Puffer B gewaschen und mit neuem Puffer B auf einen Schüttler gestellt. Der Puffer wurde anschließend durch 500ml frischen Puffer B mit 420µl Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Amersham Biosciences) ersetzt. Die Lösung musste abgedunkelt bei Raumtemperatur (RT) für eine Stunde schütteln. In dieser Zeit band der Streptavidin-Komplex an die biotinylierten Primer. Danach wurde der Puffer verworfen, die Membranen mit frischem Puffer B ab gespült und noch zweimal für 10min in Puffer B geschüttelt. Im Anschluss wurden die Membranen einmal kurz mit 2xSSC Puffer ab gespült und zweimal für 10min in 2xSSC Puffer gewaschen.

Die Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen für die Hybridisierung, sofern diese nicht fertig als Kit gekauft wurden, sind in Tabelle 2.4 angegeben.

Zur Detektion wurden 125ml ECL1 mit 125ml ECL2 Lösung (Amersham Biosciences) und 150µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gemischt und für 1min auf die Membranen gegeben. Durch die Reaktion wurde Licht emittiert, welches über Schwärzung auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.2).

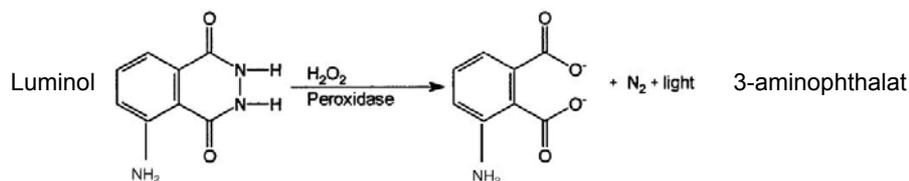


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Peroxidase Nachweisreaktion.

Die Membranen konnten für verschiedene Primer mehrfach hybridisiert werden. Dazu wurden die Membranen in 0,25% SDS für 10min aufgekocht, um die gebundenen Hybridisierungsprimer von der DNA abzulösen. Die Membranen konnten bis zu nächsten Hybridisierung einige Zeit feucht und kühl aufbewahrt werden.

Tabelle 2.4: Verwendete Lösungen für die Hybridisierung.

Hybridisierungspuffer	14,6g Natriumchlorid (NaCl) 25g Blocking Reagenz* 500ml ECL-Gold Hybridization Buffer* zu 50ml aliquotieren und einfrieren *Amersham ECL-Hybridisierungs Kit
Puffer A	250ml 20xSSPE 10ml 10% (v/v) Triton X-100 ad 1000ml H_2O bidest. Frisch ansetzen.
10% Triton X-100	10ml Triton X-100 in 90ml H_2O bidest. unter ständigem rühren langsam lösen.
20x SSPE	350,6g NaCl 71,2g Dinatriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) ad 2000ml H_2O bidest. pH mit NaOH auf 7,4 einstellen
TMACI Stock Tetramethylammoniumchlorid (3M)	500g TMACI mit 500ml H_2O bidest auflösen und mit zwei gehäuften Löffeln Aktivkohle über Nacht rühren lassen. Am nächsten Tag abfiltern.
TMACI Gebrauchslösung	640ml TMACI Stock 10ml 10% Triton X-100 ad 1000ml H_2O bidest. Frisch ansetzen.

Puffer B	1000ml H ₂ O bidest. vorlegen 120g Harnstoff zugeben, lösen 20g Dextransulfat zugeben, lösen 200ml Triton X-100 (unverdünnt), langsam zugeben ad 2000ml H ₂ O bidest. Frisch ansetzen.
20xSSC	350,6g NaCl 176,4g tri-NaCitrat-Dihydrat ad 2000ml H ₂ O bidest.

2.3.4 Gelsysteme

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Gelsysteme benutzt: Zunächst wurde zur Etablierung des Nachweises der endodermalen Differenzierung durch RT-PCR die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit Silberfärbung ausgewählt. Diese Methode war sehr sensitiv und zeigte auch geringe Veränderungen der Genexpression auf. Allerdings konnten mit dieser Methode nur eine geringe Anzahl von Proben mit relativ hohem Zeitaufwand analysiert werden. Daher wurde das Gelsystem nach einiger Zeit auf Agarose mit Ethidiumbromid (EtBr) Färbung umgestellt. Hier konnten viele Proben gleichzeitig mit geringem Zeitaufwand aufgetrennt werden. Die 10-mal niedrigere Nachweisgrenze dieser Methode wurde kompensiert, indem die RNA Konzentration in der RT-PCR erhöht wurde und mehr Probenvolumen auf die Gele aufgetragen wurde. Als Größenstandard wurde eine 100bp DNA Leiter (Peggold, Peqlab) auf die Gele aufgetragen. In beiden Gelsystemen wurde 1xTBE Laufpuffer verwendet (10xTBE = 890mM Tris/Base, 890mM Borsäure, 25mM EDTA, Carl Roth).

PAGE und Silberfärbung

Nach der RT-PCR wurden die Proben auf einem Polyacrylamid Gel aufgetrennt und die Nukleinsäure durch eine Silberfärbung nachgewiesen.

Die Gele wurden auf 5% in 1xTBE eingestellt (40% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, Sigma) und auf eine Gelbond Folie (GelFix, Serva) mit TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin, BioRad) und 10% APS (Ammoniumpersulfat, Sigma)

polymerisiert. Die Auftrennung der Proben und des Größenstandards erfolgte anschließend bei 500Volt in einer kühlbaren Elektrophorese-Apparatur.

Nach dem Lauf wurde das Gel für 10min in einer Lösung aus 10% Ethanol + 0,5% Essigsäure fixiert, danach für 10min in einer Silberlösung (1,9g/l Silbernitrat, Merck) gefärbt, 3x kurz mit Aqua dest. gewaschen und anschließend entwickelt (1,5% w/v Natronlauge + 0,08% w/v Natriumborhydrid + 0,15% v/v Formaldehyd). War die Nukleinsäure als braune Bande gut zu erkennen, wurde die Reaktion mit Natriumcarbonat (7,5g/l) abgestoppt. Die Gele wurden zur Dokumentation gescannt und konnten für eine längere Lagerung getrocknet werden.

Agarosegele

Die Produkte der RT-PCR (2.3.2) und des Restriktionsverdaus (2.4.5) wurden auf Agarosegelen aufgetrennt. Die Größe der PCR Amplikons lag bei 755-213 Basenpaaren (bp), für ihre Auftrennung wurde eine Gelprozentigkeit von 2% (w/v) gewählt. Bei den Testverdaus variierte die Prozentigkeit je nach Größe der Fragmente. Als Laufpuffer diente 1xTBE, als Probenpuffer wurde ein 5x Sucrosepuffer verwendet (20g Sucrose ad. 50ml H₂O dest., Bromphenolblau und Xylencyanol). Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte über die Zugabe von EtBr ins Gel (auf 100ml Gellösung je 3µl 10mg/ml EtBr Stocklösung, Merck). Beim Lauf interkalierte das EtBr in die Nukleinsäure und konnte unter einem UV-Schirm als leuchtende Banden sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.4 Transfektion

2.4.1 Plasmid

Für die Transfektion der USSC wurde von der Firma Develogen in Göttingen ein Plasmid mit dem humanen PAX4 Gen zur Verfügung gestellt. Dem hPAX4-Plasmid lag das pcDNA3.1+ Plasmid (5428bp, Invitrogen) zu Grunde, aus dem ein 84bp langes Stück mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NheI* und *NotI* herausgeschnitten wurde. Eine 2633bp lange cDNA mit den Genen hPAX4, IRES (Internal Ribosomal Entry Site) und eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) wurde anschließend durch Ligation eingefügt. Die *NheI* Schnittstelle wurde bei diesem Prozess zerstört, das Gesamtkonstrukt hatte eine Größe von 7977bp (Abb.2.3).

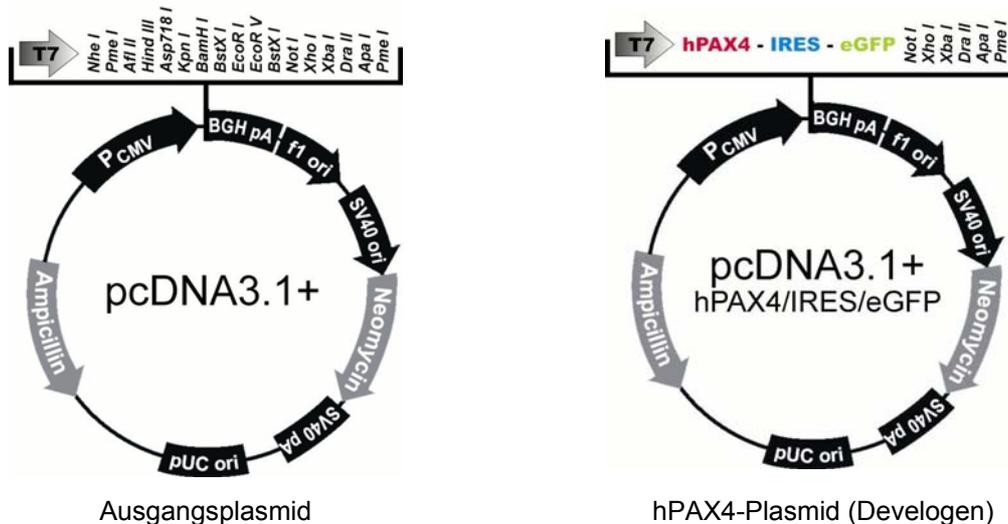


Abbildung 2.3: Vektorkarten des *pcDNA3.1+* und des *pcDNA3.1+hPax4/IRES/eGFP* Plasmides

2.4.2 Amplifikation des Plasmides

Das *pcDNA3.1+hPax4/IRES/eGFP* Plasmid wurde durch den Einsatz von „One Shot Top-10“ chemisch kompetenten Zellen (Invitrogen) mittels Schnellprotokoll für Ampicillin-Selektion amplifiziert. Ein 50µl Röhrchen der kryokonservierten Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 0,5µg des von Develogen zu Verfügung gestellten Plasmides zugegeben. Das Röhrchen wurde durch Antippen leicht geschüttelt und 5min auf Eis inkubiert. Danach wurden jeweils 4µl und 40µl der Zellsuspension auf zwei vorgewärmte LB Agarplatten (20g/l LB Medium, Invitrogen; 12g/l Selectagar, Gibco) mit Ampicillin (100µg/ml, Sigma) ausgestrichen und kopfüber bei 37°C über Nacht im Brutschrank gelagert.

Am nächsten Morgen wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Spitze von einer der Platten genommen, in 3ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach ca. acht Stunden wurde 100µl der Zellsuspension abgenommen, in einen sterilen 500ml Erlenmeyerkolben mit 250ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

2.4.3 Aufreinigung des Plasmides

Die Aufreinigung des Plasmides aus den chemisch kompetenten Zellen erfolgte mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers.

2.4.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Nukleinsäurekonzentration sowie der Reinheitsgrad einer Probe konnte im Spektralphotometer (Beckmann DU 640 Spektrometer) durch Aufnahme eines UV-Spektrums bestimmt werden. Zwischen der gemessenen Absorption und der Nukleinsäurekonzentration besteht folgende Beziehung:

RNA	1 $A_{260} \cong 40 \mu\text{g/ml}$
DNA	1 $A_{260} \cong 50 \mu\text{g/ml}$

A_{260} = Absorption bei 260nm (auch OD_{260} = Optische Dichte bei 260nm)

2.4.5 Restriktionsverdau

Um die Qualität des amplifizierten Plasmides zu überprüfen wurde der Vektor einem Testverdau unterzogen. In diesem Fall wurden die Restriktionsenzyme *NotI* und *SstI* (Invitrogen) ausgewählt. Insgesamt 1,4 μg DNA wurden mit 10U *SstI* und 15U *NotI* im Reaktionspuffer II über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Enzyme zerschnitten den Vektor bei vollständigem Verdau in drei Teile (2714/1560/1153bp). Auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel wurde der Verdau gegenüber dem ungeschnittenen Plasmid aufgetragen, welches im Gel zwei Banden zeigte: Die durch Strangbruch entstandene lineare und die verdrillte supercoiled Form.

2.4.6 Nukleofektion

Die Nukleofektion wurde mit dem Human MSC Nucleofector Kit (Amaxa) im Nucleofector (Amaxa) durchgeführt. Die verwendeten USSC wurden trypsinisiert, pelletiert und gezählt. 1×10^6 Zellen wurden abgenommen, in PBS gewaschen, pelletiert und in 100 μl Nucleofection Solution (Human MSC Nucleofector Kit) resuspendiert. In ein 1ml Reaktionsgefäß wurden 5 μg des zu transfizierenden Plasmides vorgelegt. Die Zellsuspension wurde zur DNA gegeben, kurz gemischt und in eine Küvette überführt. Am Gerät wurde dann entweder das Programm „U-23“ für eine hohe Transfektionsrate, aber eine niedrige Überlebensrate, oder das Programm „C-17“ für eine niedrige Transfektionsrate, aber eine hohe Überlebensrate ausgeführt. Die Küvette wurde zügig aus dem Gerät genommen und mit 500 μl warmen DMEM+30%FCS gespült (Erholungsphase für die Zellen). Anschließend konnte die Zellsuspension aus der Küvette entnommen und mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und ausplattiert werden.

2.4.7 Selektion der transfizierten Zellen

Nach der Nukleofektion brauchten die Zellen einige Tage Zeit um sich zu erholen, bevor sie wieder begannen sich zu teilen. Um die transfizierten Zellen von nicht-transfizierten zu trennen, wurde dem Medium 100µg/ml Geneticin (G418, Gibco) zugesetzt. Die transfizierten Zellen enthielten auf dem Plasmid das Resistenzgen Neomycin, welches sie immun für G418 macht. Alle nicht-transfizierten Zellen starben durch die Gabe von Geneticin ab.

2.5 Schnitte und Färbungen

2.5.1 Gewebe und Zellen

- Nicht-pathologisches, humanes Gewebe wurde freundlicherweise von P.D. Dr. med. Jochen Seißler aus der Deutschen Diabetes-Klinik in Düsseldorf und von PD Dr. med. Matthias Peiper aus der Chirurgischen Abteilung der Universitätskliniken Düsseldorf zur Verfügung gestellt.
- Das verwendete frische Schafgewebe für die Cokulturen wurde von der Schaffarm Görsmeyer in Düsseldorf aus Schlachtabfällen bezogen.
- Zellen der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 wurde freundlicherweise von der Neuropathologischen Abteilung der Universitätskliniken Düsseldorf zur Verfügung gestellt.
- Ratten-Hepatozyten (rHeps) wurden von der Firma Cambrex bezogen.

2.5.2 Gefrierschnitte

Kryokonserviertes Gewebe wurde mit einem Gefriermikrotom (Leica CM 1850) in 10µm dicke Schnitte zerteilt, auf Poly-Lysin beschichtete Objektträger (Menzel Gläser) aufgebracht und für 5-10min auf einer Wärmeplatte bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte noch eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert, bis diese völlig trocken waren. Bis zur Färbung konnten sie bei -80°C eingefroren werden.

2.5.3 Färbungen

Antikörperfärbung mit DAB

Für die Antikörperfärbung der Gewebeschnitte wurde das EnVision Kit + System, HRP (Dako Cytomation, Hamburg) verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) + Substrat-Chromogen führte zu einem braunen Niederschlag an der Stelle der Antikörper-Antigen Bindung. Zum Verdünnen des jeweiligen Antikörpers auf die empfohlene oder austitrierte Konzentration, wurde 1% BSA (Bovines Serum Albumin) in TBS (Tab.2.6) eingesetzt.

Die Schnitte wurden von -80°C direkt in eine -20°C kalte Aceton/Ethanol Lösung überführt und für 10min fixiert. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei RT, wie in Tabelle 2.5 angegeben.

Tabelle 2.5: Färbeprotokoll für DAB in Gewebeschnitten.

min	Schritt
5	mit PBS waschen
15	mit Peroxidase Block (Kit) inkubieren
5	mit Aqua dest. waschen
5	mit TBS waschen
10	mit Protein Block (Kit) inkubieren
60	mit Antikörper inkubieren
2	mit TBST waschen
0,5	mit TBS waschen
30	mit Polymer (Kit) inkubieren
2	mit TBST waschen
0,5	mit TBS waschen
1-10	mit DAB entwickeln
-	mit Aqua dest. abstoppen

Um die angefärbten Zellen im Gewebeverband besser einordnen zu können, wurde zusätzlich eine Hämalaun-Färbung angeschlossen, welche Zellkerne unspezifisch blau anfärbte. Dazu wurden die Schnitte nach dem Abstoppen der DAB Färbung für einige Minuten in ein Hämalaun Bad getaucht und dann mit Leitungswasser entwickelt. Anschließend wurde das Objekt mit Glycerin für die Mikroskopie eingefasst.

Tabelle 2.6: Lösungen für das DAB Färbeprotokoll

Aceton/Ethanol	1:1 mischen auf -20°C lagern
TBS	50mM Tris 300mM NaCl pH7,4
TBST	50mM Tris 300mM NaCl 0,1% Tween20 pH7,4
Hämalaun	1g Hämatoxylin 0,2g Natrium- oder Kaliumjodat 50g Aluminiumkaliumsulfat 1g Zitronensäure ad H ₂ O 1000 ml

PAS Färbung

Mit Hilfe der Periodic-Acid-Schiff (PAS) Färbung konnten Polysaccharide nachgewiesen werden. Im Lebergewebe wurden so die glykolhaltigen Zellkomponenten rosa angefärbt. Die unspezifische, im Protokoll integrierte, Hämalaun Färbung, färbte die Zellen blau.

Für die PAS Färbung wurden zum einen Zellen verwendet, die direkt auf Objektträgern kultiviert und darauf getrocknet worden sind (Culture Slides, BD Falcon); zum anderen wurden Zellen verwendet, welche auf Zellkulturschalen differenziert wurden. Letztere wurden zur Analyse mit einem Zellschaber im Medium abgekratzt. Die so entstandene Zellsuspension wurde anschließend auf Poly-Lysin beschichteten Objektträgern ausgestrichen und getrocknet. Die Zellen konnten in beiden Fällen sofort verwendet oder bis zur Färbung bei -80°C tiefgefroren werden.

Für die Färbung wurden die Zellen zunächst in einer Lösung aus 90% Methanol und 10% Formaldehyd (37%) für 10min fixiert und anschließend nach Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich) PAS gefärbt. Die Zellen wurden danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe in den Schritten 50/75/96/100% Ethanol und Roticlear

(Carl Roth) entwässert. Die Objektträger wurden später für die Mikroskopie mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

2.5.4 Western Blot

Humane (50ng/Spur) und Ovine (Schaf, 200ng/Spur) Serumproteine wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel in einem Biorad Tank-System aufgetrennt. In der gleichen Apparatur wurde das Gel anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Biosciences) geblottet. Die Membranen mit den übertragenen Proteinen wurden danach in 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in PBS mit 0,5% Tween (PBS-T, Sigma-Aldrich) abgesättigt. Über Nacht wurde anschließend bei 4°C mit dem 1:5000 verdünnten human-spezifischen Albumin Antikörper (HSA-11, Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach fünf Waschschritten für 5min in PBS-T wurde HRP-Oxidase (Amersham Biosciences) mit gekoppeltem Zweitantikörper 1:2000 verdünnt zugegeben und bei RT für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Membranen mit dem Amersham Biosciences ECL-Kit nach Herstellerangabe entwickelt (vergleiche auch 2.3.3).

2.6 Differenzierung der USSC

2.6.1 *In vivo* Systeme

In utero Schaf Modell

Das Projekt wurde in Kooperation mit Prof. Zanjani in Reno/USA durchgeführt (Flake *et al.* 1986). Die Zellen wurden kryokonserviert verschickt, vor Ort aufgetaut und für drei Tage in DMEM + 30% FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt: Zelllinie SA061 4. Passage ($3,2 \times 10^7$ Zellen) und Zelllinie SA073 4. Passage ($8,9 \times 10^7$ Zellen).

Die Zellen wurden dann für die Transplantation wie folgt vorbereitet: SA061 wurde in 2ml serumfreiem Medium aufgenommen und in drei Spritzen aliquotiert (Zellzahl pro Spritze $\approx 1 \times 10^7$ c / 600µl). SA073 wurde in 5ml serumfreiem Medium aufgenommen und in sieben Spritzen aliquotiert (Zellzahl pro Spritze $\approx 1,2 \times 10^7$ c/600µl). Es wurden insgesamt 10 Mutterschafe mit 20 Föten für die Transplantation eingesetzt. Die Mutterschafe trugen zwischen einem und drei Föten. Jede Spritze mit Zellsuspension

wurde auf alle im Uterus befindlichen Föten aufgeteilt. Die Zellzahl pro Fötus betrug bei einem Fötus/Uterus 1×10^7 c/600 μ l, bei zwei Föten/Uterus 5×10^6 c/300 μ l und bei drei Föten/Uterus $3,3 \times 10^6$ c/200 μ l. Die Föten waren bei der Injektion 62 bzw. 63 Tage alt. Drei Monate nach der Operation kamen 17 der 20 Lämmer zur Welt. 17 Monate nach der Transplantation wurde den Tieren Blut abgenommen und das Serum über Western Blot (2.5.4) auf humanes Albumin hin untersucht.

Zwei Jahre nach der Geburt wurden vier der Lämmer getötet, Gewebe von allen Organen entnommen und ein Teil in Formaldehyd konserviert, ein anderer Teil wurde in ca. 5x5mm große Würfel geschnitten und auf Trockeneis schockgefroren. Die gefrorenen Gewebe wurden zur Analyse mit einem Kryostaten geschnitten, auf Poly-Lysin Objektträgern getrocknet und mit dem mouse anti-human nuclei monoclonal AB (HuNu, Chemicon) gefärbt (2.5.3), um humane Zellen im Schafgewebe nachzuweisen.

uPA-Scid Maus Modell

Das Projekt wurde in Kooperation mit Prof. Leroux-Roels in Gent/Belgien durchgeführt. Das für humane-Hepatozyten etablierte Protokoll wurde hier für USSC eingesetzt (Meuleman *et al.* 2005). In Kultur befindliche SA5/03 Zellen in der 3. Passage wurden vor Ort trypsiniert, in PBS aufgenommen und gezählt. Insgesamt fünf 14 Tage alte, homozygote uPA-Scid-Mäuse wurden für die Transplantation eingesetzt. Die Tiere wurden betäubt und die Milz freigelegt. Drei Tieren wurde 20 μ l Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen und zwei Tieren 20 μ l Zellsuspension mit $2,25 \times 10^6$ Zellen in die Milz injiziert. Nach vier und acht Wochen wurde den Tieren von der Arbeitsgruppe vor Ort Blut abgenommen und das Serum auf humanes Albumin und alpha-Fetoprotein mit Hilfe eines ELISA Tests untersucht. Die Nachweisgrenze für humanes Albumin lag bei 1,3 μ g/ml, für humanes alpha-Fetoprotein bei 12,1 ng/ml. Nach acht Wochen wurden die Mäuse getötet und die Milz, sowie die Leber der Mäuse schockgefroren, geschnitten und mit dem HuNu Antikörper gefärbt (2.5.3).

2.6.2 In vitro Systeme

Faktoren

Für die endodermale Differenzierung der USSC mit Faktoren wurden die in Tabelle 2.7 angegebenen Komponenten verwendet.

Tabelle 2.7: Verwendete Komponenten für die endodermale Differenzierung mit Faktoren.

Komponente	Konzentration	Firma
Beschichtung		
Fibronectin		Sigma
Laminin		Tebu
Matrigel	1/2/5%	BD Biosciences
Tissue culture treated only		
Medium		
X-Vivo 15		Cambrex
Neurobasal		Gibco
DMEM low glucose		Cambrex
Knockout DMEM high glucose		Gibco
IMEM		Gibco
Serum		
FCS	0-30%	Cambrex
SR		Gibco
Supplemente		
B27		Gibco
N2		Gibco
ITS		Sigma
Zytokine		
HGF	10/20/50 ng/ml	R&D
NGF	100 ng/ml	R&D
bFGF	10/25/50 ng/ml	Sigma
EGF	10 ng/ml	R&D
PDGF	10 ng/ml	R&D
LIF	10 ng/ml	Sigma
IGF-1	10 ng/ml	R&D
FGF4	10/20/25 ng/ml	R&D
BMP2	10 ng/ml	-*
OSM	10-1000 ng/ml	R&D
Sonstiges		
Leber Verdau	2%	Oxoid
Nikotinamid	10mM	Sigma
Dexamethason	$5 \times 10^{-7} / 10^{-9}$ M/ml	Sigma
Ascorbinsäure	0,1mM	Sigma
Retinolsäure	10 μ M	
HepG2 Überstand		

-* Eigensynthese. BMP2 wurde freundlicherweise von Frau Karin Berr zur Verfügung gestellt.

Die für die Differenzierung ausgewählten USSC wurden zunächst in DMEM+30%FCS in 30%iger Konfluenz auf Zellkulturschalen unterschiedlicher Größe oder culture slides (BD/Falcon) ausgesät. Nachdem die Zellen adhärent geworden waren, wurde das Zellkultumedium abgenommen und das Differenzierungsmedium zugegeben. Die Differenzierungsmedien wurden zweimal wöchentlich gewechselt, Retinolsäure jedoch täglich. Die Beschichtung mit Laminin erfolgte mit einer Konzentration von 10 μ g/ml in PBS bei 4°C über Nacht. Fibronectin wurde mit 5ng/ml

in PBS bei 37°C über Nacht inkubiert. Unverdünntes Matrigel gelierte bei RT, es wurde daher im Kühlschrank aufgetaut, mit kaltem PBS auf die gewünschte Prozentigkeit verdünnt (v/v) und für eine Stunde bei RT inkubiert. Alle Beschichtungen wurden vor dem Aussäen der USSC noch einmal mit PBS gespült.

Knockout DMEM wurde von Schuldiner vorgestellt (Schuldiner *et al.* 2000). Hier wurde 80% Knockout DMEM mit hoher Glukose Konzentration mit 20% Knockout SR Serumersatz (Gibco) versetzt. Des Weiteren wurde dem Medium 0,1mM β -Mercaptoethanol (Sigma) und 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco) beigemischt (Knockout high glucose). Da die USSC normalerweise in Medium mit niedrigem Glukosegehalt gehalten wurden, wurde das gleiche Medium zusätzlich mit DMEM low glucose angesetzt (Knockout low glucose).

B27 und N2 Supplement wurden den jeweiligen Medien nach Vorschrift zugegeben, Retinolsäure (Sigma) wurde als Stocklösung in DMSO (Cryosure, WAK-Chemie) mit einer Konzentration von 20mM angelegt. 25mg Insulin, 25mg Transferrin und 25 μ g Natriumselenit Mix (ITS, Sigma) wurden in 5ml angesäuertem Wasser (steriles Wasser mit HCl auf pH2 einstellen) gelöst, mit sterilem Wasser auf 50ml 100x Stammlösung eingestellt und aliquotiert eingefroren. Die verschiedenen lyophilisierten Wachstumsfaktoren wurden nach den Angaben der Hersteller rückgelöst und ebenfalls aliquotiert eingefroren. Ascorbinsäure wurde mit PBS auf 25mM eingestellt und sterilfiltriert. Die Stammlösung konnte bei 4°C im Dunkeln für einen Monat gelagert werden. Das Pulver des Leberverdaus wurde in Zellkulturmedium (w/v) rückgelöst. Nikotinamid wurde in PBS auf 1M eingestellt, sterilfiltriert und aliquotiert eingefroren. Alle Induktionen der endodermalen Differenzierung mit Faktoren sind in Appendix A zusammengefasst.

Cokulturen mit primären Ratten-Hepatozyten

Die USSC wurden für die Cokulturen zunächst in DMEM+30%FCS ausgesät und über Nacht adhärent werden lassen. Am nächsten Tag wurden Ratten-Hepatozyten oder endodermales Gewebe für die gemeinsame Cokultivierung zugegeben. Für die Cokultivierung wurde ein spezielles *hepatocyte culture medium* (HCM, Cambrex) benutzt, welches aus einem Basalmedium (HBM) und diversen Zusätzen (SingleQuots: Ascorbinsäure, BSA fatty-acid-free, Transferrin, Insulin, hEGF) besteht. Das ebenfalls enthaltene Gentamycin wurde nicht verwendet, stattdessen wurde wie bei den anderen Medien, Penicillin und Streptomycin eingesetzt.

Für die Cokultur mit Ratten-Hepatozyten (rHeps, Cambrex) wurden kryokonservierte Ratten-Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in kaltes HCM Medium überführt und 7min bei 500rcf zentrifugiert. Nach dem Pelletieren wurde der Überstand verworfen, die Zellen resuspendiert und gezählt. Bei jeder rHeps Charge waren viele tote Zellen enthalten (>50%). Die Konzentration der Zellen wurde so eingestellt, dass ebenso viele vitale rHeps wie USSC in die Cokultur eingesetzt werden konnten. Die toten rHeps wurden nicht abgetrennt, da die abgestorbenen Zellen in Kultur in Suspension blieben und so beim nächsten Mediumwechsel entfernt wurden. Die lebenden Hepatozyten wurden dagegen auf den USSC adhären und verblieben in der Kultur.

Für eine direkte Cokultur wurden die rHeps in 10ml Differenzierungsmedium zu den USSC in 100mm Zellkulturschalen gegeben, für eine Transwell Cokultivierung wurden die USSC auf speziellen 6-well Platten (companion plates, BD Falcon) kultiviert und vitale rHeps 1:1 in passenden Zellkultur Einsätzen zugegeben. Die so genannten Transwell Einsätze (BD Falcon) haben eine PET Membran mit einer Porengröße von 1µm und können in die companion plates eingehängt werden.

Die Medien wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Da die Ratten-Hepatozyten in den Transwells in Suspension blieben, wurde das Medium nur im unteren Kompartiment gewechselt. Die 1µm Porenmembran ermöglichte einen Austausch der Faktoren im oberen 2ml- und unteren 3ml-Kompartiment, ohne dass die Zellen Kontakt zueinander hatten. Die Kulturen wurden nach mehreren Zeitpunkten von einem Tag bis hin zu sechs Wochen analysiert. In den 1-Tages Ansätzen wurden pro 100mm Schale 5×10^5 und pro 6-well 1×10^5 USSC ausgesät. In den länger laufenden Experimenten wurde pro 100mm Schale 1×10^5 und pro 6-well 2×10^4 USSC ausgesät, da die Zellen ansonsten zu konfluent wurden. Für die Analyse der 6-well Ansätze wurden je nach Dichte die Zellen von zwei bis drei wells vereint.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die vorherige Behandlung mit Staurosporin (Calbiochem) eine Differenzierung induziert. Für dieses so genannte „injury“ Modell wurden die Ratten-Hepatozyten zunächst über Nacht in HCM Medium mit 300nM Staurosporin (1mM Stock in DMSO) in einer suspensions-Zellkulturschale inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zentrifugiert, resuspendiert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die rHeps in Zellkulturmedium aufgenommen und zu den USSC gegeben.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Beschichtung mit Collagen auf die USSC und rHeps auswirkt. Dazu wurde Collagen I aus Kalbshaut (Sigma) mit H₂O dest. 1:10 auf eine Konzentration von 0,01% verdünnt und einige Milliliter davon auf Zellkulturschalen ausgebracht. Die Schalen wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert und die Collagenlösung am nächsten Tag abgenommen. Die verbliebene Flüssigkeit wurde anschließend abgedampft und die Schalen bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

In einem weiteren Experiment wurden dreidimensionale Sphären, so genannte „hanging drops“ für die Cokultur produziert. Dazu wurden 200, 500 oder 2000 USSC pro 20µl Zellkulturmedium eingestellt. Anschließend wurden die 20µl Tropfen auf dem umgedrehten Deckel einer 100mm Zellkulturschale aufgebracht und dieser mit den Tropfen anschließend kopfüber auf eine mit PBS gefüllte Schale gelegt. Die Tropfen wurden durch Adhäsion auf dem Untergrund festgehalten, so dass diese beim Umdrehen nicht zusammen liefen (Abb.2.4).

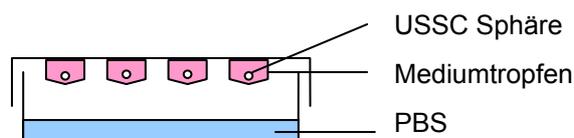


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der hanging drop Kultur

Nach einigen Tagen bildet sich aus den einzelnen Zellen eine kompakte Kugelstruktur. Sät man die Sphären anschließend jedoch auf einer Kulturschale für Adhäsionskulturen (tissue culture treated) aus, so zerfielen die Strukturen und bilden wieder einen adhärennten Monolayer aus.

Cokulturen mit Leber- und Pankreasgewebe vom Schaf

Für die Cokultur mit Schafgewebe wurde die Leber und das Pankreas direkt nach dem Schlachten entnommen und die vollständigen Organe in steriles PBS überführt. Aus dem Inneren der Leber wurde dann unter sterilen Bedingungen ein Gewebestück entnommen und mit einem Skalpell in möglichst dünne Scheiben zerschnitten. Da das Pankreas kein solides Organ darstellt, wurde hier das Gewebe direkt zerteilt, ohne Proben aus dem Organinneren zu entnehmen. Die Gewebestückchen wurden dann zunächst mit sterilem PBS gespült und anschließend in die jeweiligen Cokultur Medien (HCM oder DMEM + 10% FCS)

überführt. Da die Gewebe noch Blut enthielten und unter Umständen Keime tragen konnten, wurden die Organstücke über Nacht in der doppelten Konzentration Penicillin und Streptomycin (2.1.1) und 2µg/ml Amphotericin B (Bristol-Meyers Squibb) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe für die Transwell Cokultur aus der Vorinkubation in das obere Kompartiment der Transwells mit frischem Medium überführt. Die USSC wurden auf der 6-well companion Platte im unteren Kompartiment kultiviert.

Für die Generierung von konditioniertem Medium wurden die Gewebestücke nach der Vorinkubation in neues Medium überführt (DMEM, DMEM+5%FCS, HCM, HBM), welches ca. alle zwei Tage gewechselt wurde. Das konditionierte Medium (CM) wurde dann über zwei Wochen gesammelt, gepoolt und sterilfiltriert. Für eine längere Lagerung wurde das Medium aliquotiert eingefroren.

Im Experiment wurden entweder täglich 10ml CM aufgetaut und mit 10ml frischem Medium zu den USSC auf 100mm Schalen gegeben, oder es wurde unverdünntes CM eingesetzt und am Tag 0 der Cokultur 10µM Retinolsäure zugefügt. Danach wurde täglich ein frisches Aliquot CM aufgetaut und ohne Retinolsäure zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden in beiden Fällen an Tag 1, 3 und 7 analysiert.

Cokulturen mit humanem Lebergewebe aus einer Biopsie

Bei der Cokultur mit humaner Leber wurde das Gewebe sofort nach der Operation ebenso wie das Schafgewebe zerteilt und über Nacht in Medium mit Antimykotikum- und erhöhter Antibiotikum-Konzentration überführt. In diesem Fall blieb das Gewebe für zwei Tage in dem Medium und wurde erst dann über ein Transwell mit USSC cokultiviert. Das Medium der Vorinkubation wurde hier nicht verworfen, sondern sterilfiltriert und als konditioniertes Medium frisch zu einem neuen Ansatz mit USSC gegeben. Nach 11 Tagen wurden die Zellen im Medium abgeschabt, pelletiert und mit RLT-Puffer (2.3.1) lysiert.

Alle Cokulturen sind in Appendix B zusammengefasst.

Ergebnisse

3

3.1 Charakterisierung der USSC

Die unrestringierte, somatische Stammzelle aus Nabelschnurblut (USSC) ist eine adhärent wachsende Zelle, mit spindelförmiger Morphologie und einer Größe von 20-25µm (Abb. 3.1).

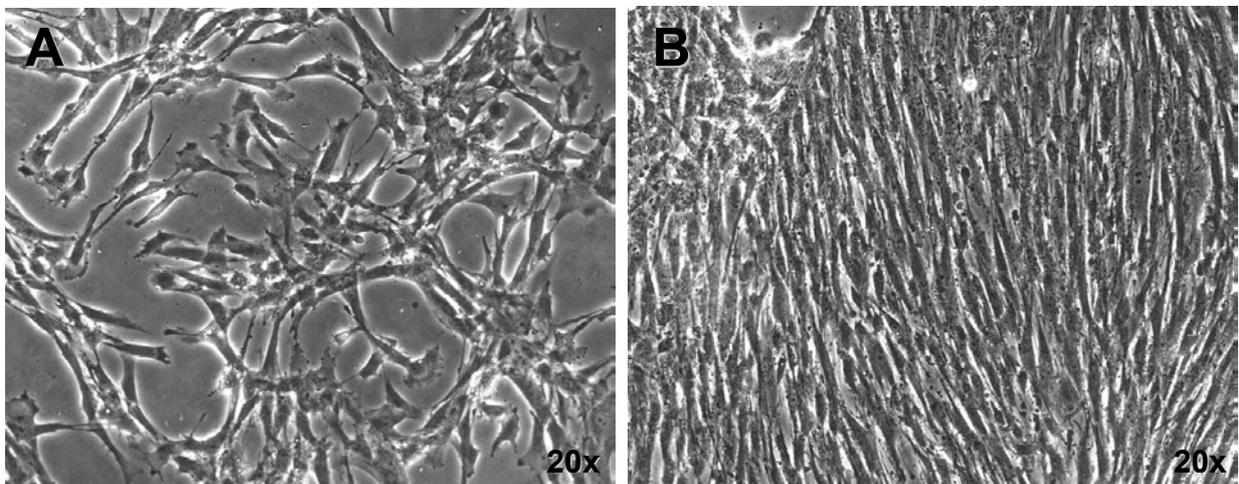


Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme der Morphologie der USSC bei **A** 50% und **B** 100% Konfluenz.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten USSC-Zelllinien aus 94 von insgesamt 233 Nabelschnurbluten generiert werden. Dabei unterschied sich die Generierungsfrequenz der USSC bei Kultivierung in verschiedenen Medien: bei Kultivierung in H5100 Medium konnten zu 58% USSC generiert werden (aus 51 von 88 Nabelschnurblutpräparaten).

Bei Kultivierung der Zellen in DMEM + 30% FCS Medium konnten nur in 29,7% der Fälle eine Generierung der USSC erreicht werden (aus 43 von 145 Präparaten). Trotz der höheren Generierungsfrequenz in H5100 wurde für die Kultivierung der Stammzellen DMEM + 30% FCS vorgezogen, da in H5100 Zusätze (Ascorbinsäure, Phosphate) enthalten sind, welche die Zellen zusammen mit Dexamethason in osteogener Richtung differenzierten.

Bei einer durchschnittlichen Generierungsfrequenz in beiden Medien von 40,3% spielten weder das Gestationsalter mit durchschnittlich 39,5 Wochen (in den nicht erfolgreichen Generierungen 39,1 Wochen), das Alter des Blutes bis zu Aufarbeitung mit durchschnittlich 19,9 Stunden (20,3h), das Nabelschnurblutvolumen mit durchschnittlich 80ml (79,3ml) inklusive 29ml Citrat zur Gerinnungshemmung, noch die Anzahl der kernhaltigen Zellen (MNC) mit durchschnittlich $1,89 \times 10^8$ Zellen ($1,86 \times 10^8$ Zellen), eine Rolle (Abb. 3.2).

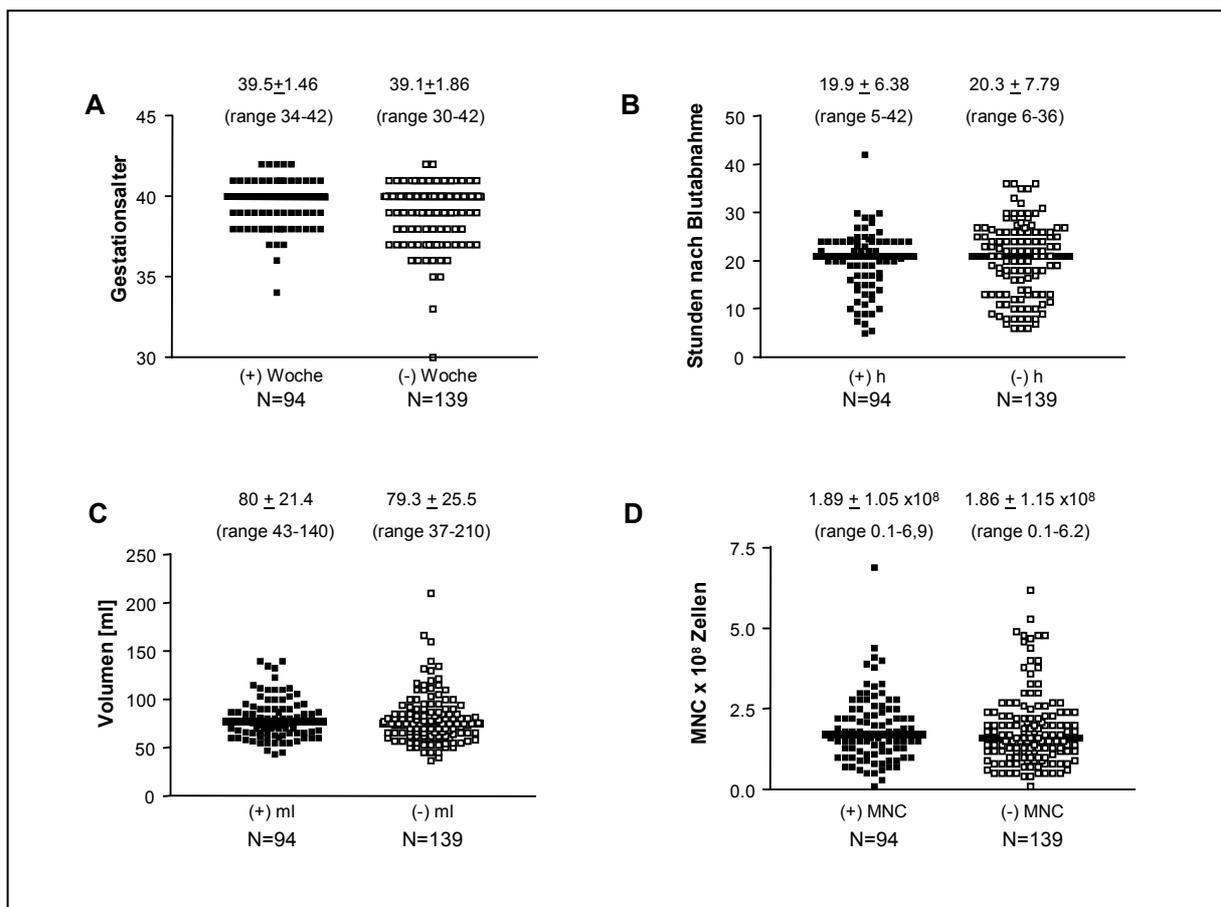


Abbildung 3.2: Auswertung der Generierungsparameter der 233 Nabelschnurblute. (+) es konnten USSC Kolonien generiert werden, (-) es konnten keine USSC Kolonien generiert werden.

Nach ein bis drei Wochen entstanden durchschnittlich 4 USSC Kolonien (1-11) aus der kultivierten MNC Fraktionen. Die Zellen ließen sich über 20 Passagen (>40

Verdopplungen) rechnerisch auf über 10^{15} Zellen expandieren, ohne dass sich Auffälligkeiten im Karyogramm zeigten (Kogler *et al.* 2004).

Die Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Zelllinien ergab, dass die USSC negativ für die Oberflächenantigene CD14, CD33, CD34, CD45, CD49b, CD49c, CD49d, CD49f, CD50, CD62E, CD62L, CD62P, CD106, CD117, Glycophorin A und HLA-DR waren, jedoch CD13, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105, Vimentin, Cytokeratin 8 + 18 und humanes Endo (CD146), sowie niedrige Level an CD10 und FLK1 (KDR) exprimierten. Außerdem zeigten sie variable, aber schwache Expression von HLA-ABC (vgl. Abb.3.3 und Tab. 3.1).

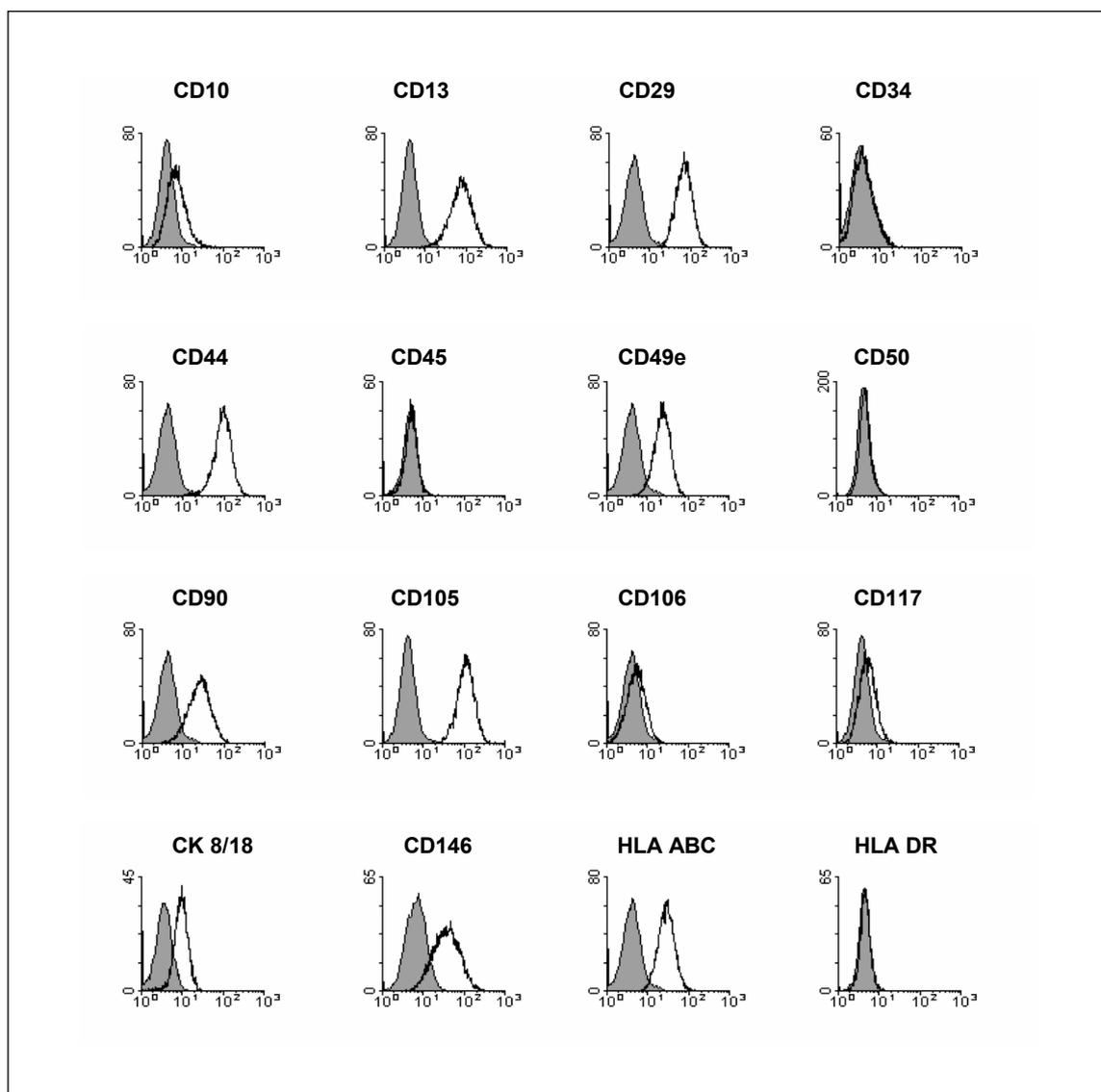


Abbildung 3.3: Durchflußzytometrie für ausgewählte Antigene. Die grau gefüllten Kurven entsprechen der Negativkontrolle, die ungefüllten Kurven entsprechen den angegebenen Antigenen.

Tabelle 3.1 : Phänotypische Charakterisierung der USSC

CD Lokus oder Antigen Name	Bezeichnung	Expression
Hämatopoietische/ Leukozyten Antigene		
CD4	T4	-
CD8	T8	-
CD10	CALLA	+ (schwach)
CD13	APN, Gp150	+
CD14	LPS-R	-
CD15	X-hapten	-
CD16	FC γ RIIIa	-
CD33	P67	-
CD34	Gp 105-120	-
CD45	LCA	-
CD90	Thy-1	+
CD117	c-Kit	-
CD133/1	AC133	+*
CD133/2	AC141	+*
HLA-class I (ABC)		-/+*
HLA-class II (DR)		-
Glycophorin A		-
Endotheliale Antigene		
FLK-1 (KDR)		+
CD146 (Human Endo)		+
Integrine		
CD11a	LFA-1 α chain	-
CD11b	Mac1	-
CD29	VLA- β chain	+
CD49b	VLA- α 2chain	-
CD49d	VLA- α 4chain	-
CD49e	VLA- α 5chain	+
CD49f	VLA- α 6chain	-
Adhesions Moleküle		
CD31	PECAM-1	-
CD44	HCAM	+
CD44H		+
CD50	ICAM-3	-
CD54	ICAM-1	+
CD58	LFA-3	+
CD62E	E-selectin	-
CD62L	L-selectin	-
CD62P	P-selectin	-
CD106	VCAM	-
CD166	ALCAM	+
Wachstumsfaktoren/ Rezeptoren		
CD25	IL-2R	-
CD123	IL-3R	+
CD71	Transferrin Rezeptor	+
Andere Antigene		
CD73	Ecto-5-nucleotidase	+
CD80	B7-1	-
CD86	B7-2	-
CD105	Endoglin	+
Vimentin		+
Cytokeratin-8		+
Cytokeratin-18		+

* Expression abhängig von den Zellkultur- und Medium Konditionen

3.2. Endodermale Differenzierung

Um die USSC in endodermaler Richtung zu differenzieren, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde auf ein bereits etabliertes Tiermodell, das *in utero* Schaf Modell zurückgegriffen, zum anderen ein neues Tiermodell, die uPA/Scid Maus eingeführt. Des Weiteren wurde die Differenzierung durch ausgewählte Faktoren sowie durch Cokultivierung mit Zellen endodermalen Ursprungs induziert. Zudem wurde untersucht, wie sich die Überexpression des exogenen zugefügten, endodermalen PAX4 Genes auswirkt. Insgesamt wurden 19 Zelllinien von der 3. bis 9. Passage für die Differenzierungsexperimente eingesetzt.

3.2.1 *In vivo* Systeme

3.2.1.1 *In utero* Schaf Modell

Das bereits vorgestellte *in utero* Schaf Modell wurde in einen Langzeitversuch eingesetzt, um zu überprüfen, wie sich die USSC nach mehreren Jahren im Tiermodell verhält. 17 Monate nach Transplantation wurde den transplantierten Schafen Blut entnommen, um im Serum enthaltenes humanes Albumin nachzuweisen. Abbildung 3.4 zeigt den Western Blot für den humanen Albumin Antikörper, welcher nicht kreuzreaktiv mit ovinen (Schaf) Albumin reagiert (Spur 1). Im Serum des chimären Schafes (Spur 3) konnte eindeutig humanes Albumin nachgewiesen werden, was auf eine Differenzierung der USSC zu funktionellen, Albumin-produzierenden Zellen hindeutet. Nach weiteren 10 Monaten wurden vier der Tiere getötet und Teile von verschiedenen Organen entnommen. Das Gewebe wurde anschließend auf humane Zellen hin mit dem human-Nuclei Antikörper (HuNu-AK) untersucht. In den Organen der untersuchten Tiere konnten jedoch zwei Jahre nach der Geburt (27 Monate post OP) keine humanen Zellen mehr nachgewiesen werden. Untersucht wurden Leber, Pankreas, Milz, Niere und Gehirn der Tiere. Alle Organe waren jedoch frei von Tumoren.

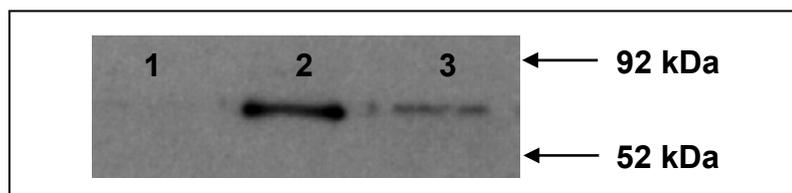


Abbildung 3.4: Western Blot für humanes Albumin. 1: Serum der Schaf Kontrolle, 2: Serum der humanen Kontrolle, 3: Serum des chimären Schafes. Im Serum des chimären Schafes konnte humanes Albumin nachgewiesen werden.

3.2.1.2 uPA-SCID Maus Modell

Alb-uPA transgene Mäuse tragen einen an den Albumin Promoter gekoppelten Urokinase-Typ-Plasminogen Aktivator (uPA) welcher bei Überexpression zu funktionell gestörten Hepatozyten und schweren Blutungen führt. Acht bis zehn Wochen nach der Geburt sterben die uPA-Scid Mäuse an Leberversagen. Injiziert man den Tieren jedoch frisch isolierte, funktionelle Hepatozyten aus dem Menschen, so können die Tiere überleben. Die humanen Zellen tragen kein Transgen und werden von den immunsupprimierten Mäusen nicht abgestoßen. Die humanen Hepatozyten sind somit in der Lage, die gestörte Mausleber zu regenerieren und das Organ kann seine Funktion nach der Transplantation wieder aufnehmen (Meuleman *et al.* 2005).

Durch die Gabe von undifferenzierten USSC konnte jedoch keine Wiederherstellung der Leberfunktion in der uPA-Maus beobachtet werden. Nach vier und acht Wochen konnte im Blut der Mäuse weder humanes Albumin, noch humanes alpha-Fetoprotein festgestellt werden. Zudem konnten nach acht Wochen weder in der Milz noch in der Leber der Maus humane Zellen mit dem Hu-Nu AK nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Die USSC waren offensichtlich aus dem Gewebe der Milz migriert, jedoch nicht in die läsionierte Leber eingewandert. Andere Gewebe wurden nicht analysiert.

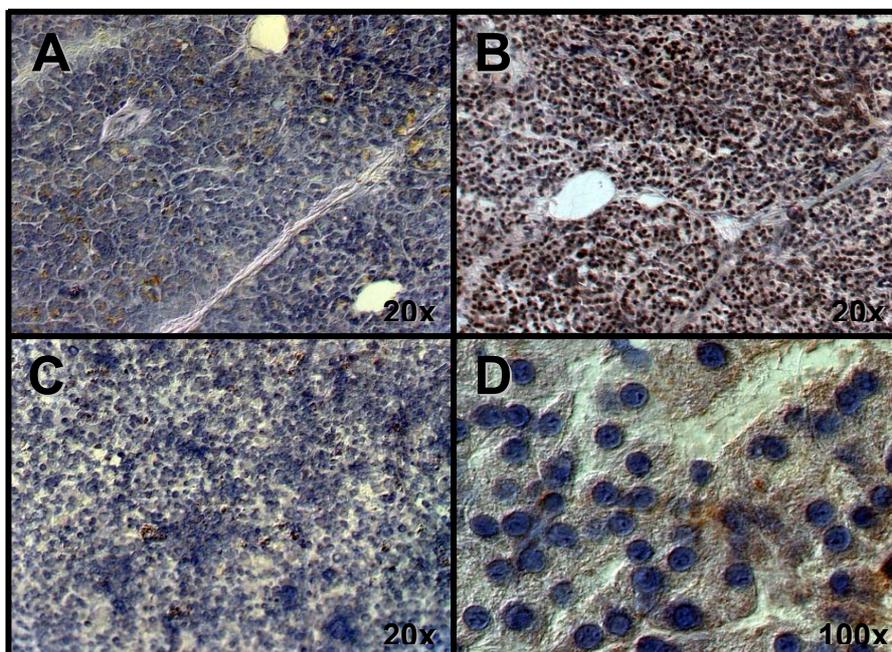


Abbildung 3.5: Lichtmikroskopische Aufnahme. **A** negative und **B** positive Färbekontrolle (humanes Pankreas), **C** Milz der chimären uPA Maus 20x und **D** 100x. Spezifische DAB Färbung gegen humane Kerne (*human nuclei AB*) braun und unspezifische Kernfärbung (Hämalaun) blau. In **C** und **D** sind keine Kerne braun angefärbt. Die zytosolische Braunfärbungen sind nicht spezifisch und waren besonders stark im Lebergewebe zu finden.

3.2.2. In vitro Systeme

Etablierung der RT-PCR zum Nachweis der endodermalen Differenzierung

Zunächst musste ein System etabliert werden, mit dem der Grad der endodermalen Differenzierung der USSC nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zweck wurde die Methode der RT-PCR gewählt. Mit Hilfe von adulter und fötaler Pankreas- sowie Leber-RNA wurden Primer für Gene etabliert, die früh in der Embryonalentwicklung von Leber und Pankreas eine Rolle spielen, als auch für späte Gene, die nur im voll ausgereiften Organ exprimiert werden. Um einen möglichst genauen Nachweis zu erreichen, wurden für alle Gene spezifische RT-Primer, zusätzlich zu den 3'- und 5'-PCR Primer erstellt. Nach erfolgreicher Amplifikation der Gene in der PCR und Auftrennung der cDNA auf einem Gel folgte ein weiterer Schritt: Ein mit Biotin gekoppelter Hybridisierungs-Primer, wurde für einen Nachweis des Amplicons durch Southern Blot eingesetzt (Abb.3.6).

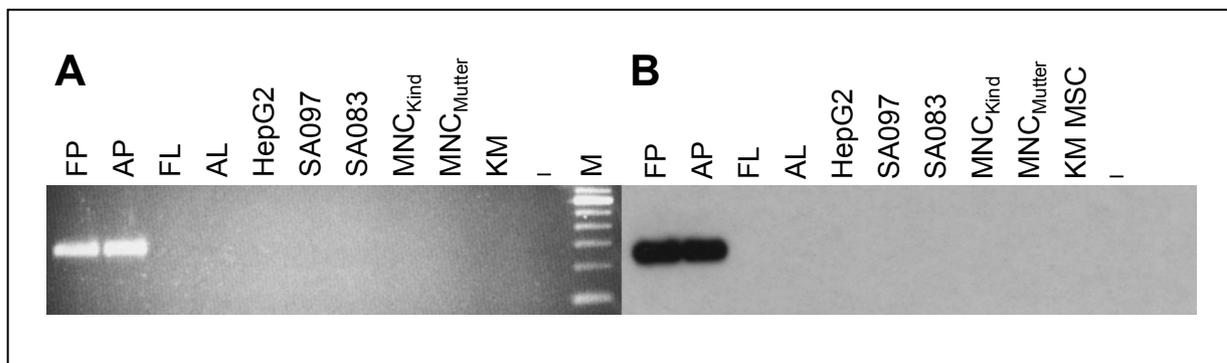


Abbildung 3.6: **A** Agarosegel und **B** Southern Blot einer RT-PCR, beispielhaft für humanes Insulin. In fötaler (FP) und adulter (AP) Pankreas gesamt RNA konnte Insulin im Gel und auf dem Blot nachgewiesen werden. Fetale (FL) und adulte (AL) Leber gesamt RNA, sowie gesamt RNA der humanen Leberkarzinom Zelllinie HepG2, die undifferenzierten USSC-Zelllinien SA097 und SA083, mononukleäre Zellen aus dem Mutter bzw. Kindblut und MSC aus Knochenmark waren negativ für die Insulin mRNA.

Insgesamt 16 Primer wurden letztlich für die Analyse der Differenzierung ausgewählt. Untersucht wurde die Genexpression der Proteine α -Fetoprotein (α -Feto), Insulin und Albumin, der Enzyme Cytochrom P450/2B6 (Cyp2B6), Cytochrom P450/3A4 (Cyp3A4) und Glykogen Synthase 2 (Gys2) sowie die Transkriptionsfaktoren *GATA binding protein 4* (GATA4), *hepatocyte nuclear factor 1* (HNF1), *hepatocyte nuclear factor 3 β* (HNF3b), *hepatocyte nuclear factor 4 α* (HNF4a), *islet-1* (ISL-1), *neurogenic differentiation 1* (NeuroD), *NK6 transcription factor related, locus 1* (Nkx6.1), *paired box gene 4* (Pax4), *insulin promoter factor 1* (PDX-1) und Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrollgen (Abb.3.7 und 3.8).

Die RT-PCRs für die Gene α -1-Antitrypsin, Amylase, Cytochrom P450/1B1 (Cyp1B1), hepatocyte growth factor (HGF), Dipeptidylpeptidase 4 (CD26) sowie die Cytokeratine 8,18 und 19 zeigten bereits eine positive Genexpression in den undifferenzierten USSC so dass die Primer für diese Gene im Weiteren nicht verwendet wurden.

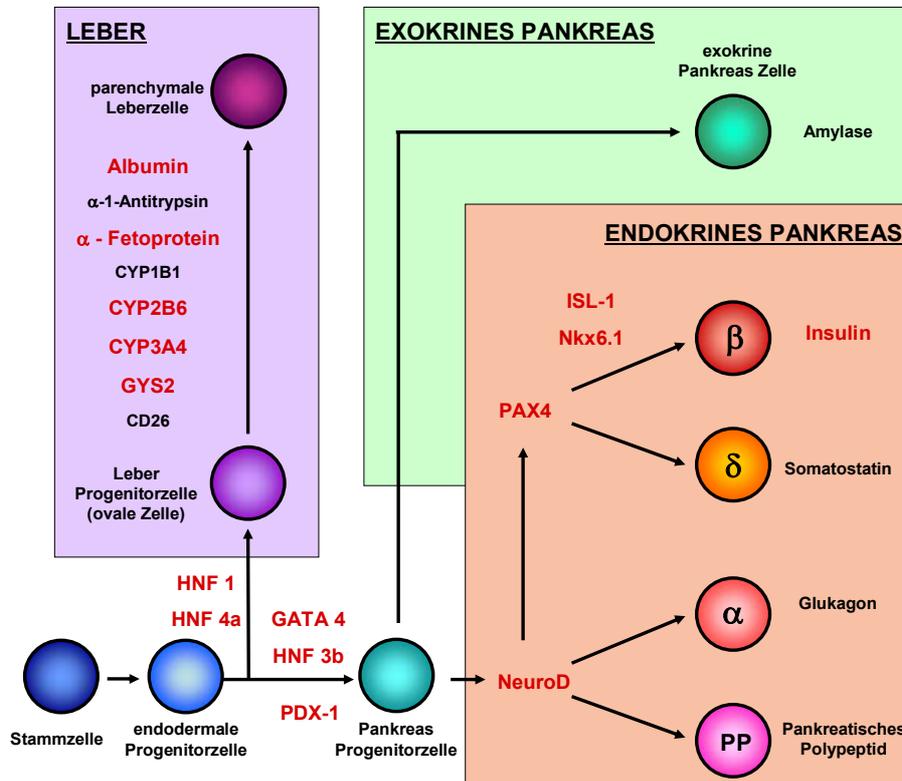


Abbildung 3.7: Schematische Übersicht der Gewebezugehörigkeit der verschiedenen untersuchten Gene. Für die rot unterlegten Gene wurde in den folgenden Experimenten die Änderung der Genexpression untersucht.

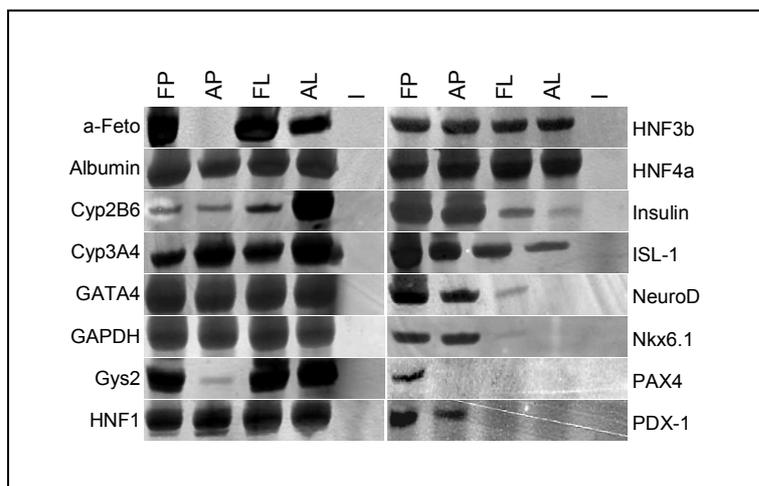


Abbildung 3.8 : PAGE/Silberfärbung

der RT-PCR für die 16 verwendeten Primer der endodermalen Gene:

FP = fötale Pankreas RNA,

AP = adulte Pankreas RNA,

FL = fötale Leber RNA,

AL = adulte Leber RNA,

- = kein Template.

Zusätzlich zur Analyse der USSC mit RT-PCR wurde eine undifferenzierte USSC Zelllinie auf einem DNA-Chip der Firma Affymetrix analysiert. Die Arraydaten spiegeln dabei im Wesentlichen die Ergebnisse der RT-PCR wieder. In Tabelle 3.2 sind alle Gene angegeben, für die Primer in der RT-PCR etabliert wurden. Die Gene, die bereits in den undifferenzierten USSC exprimiert wurden, sind grau hinterlegt.

Tabelle 3.2: Arraydaten der undifferenzierten USSC; A=Absent/P=Present

Gen	Bezeichnung	USSC T ₀		mRNA Sequenz Nummer	Uni-Gene Gruppe
SERPINA1	alpha-1 antiproteinase, antitrypsin, member 1	12,2	A	NM_000295	Hs.297681
SERPINA1	alpha-1 antiproteinase, antitrypsin, member 1	3,3	A	AF119873	Hs.297681
SERPINA1	alpha-1 antiproteinase, antitrypsin, member 1	259,5	P	AF119873	Hs.297681
SERPINA1	alpha-1 antiproteinase, antitrypsin, member 1	118,5	A	T62088	Hs.297681
AFP	alpha-fetoprotein	300,7	P	NM_001134	Hs.155421
ALB	albumin	96,6	A	AF116645	Hs.184411
ALB	albumin	34,9	A	M12523	Hs.184411
ALB	albumin	40,1	A	M12523	Hs.184411
ALB	albumin	5,6	A	D16931	Hs.406155
AMY	AMY1A /// AMY1B /// AMY1C /// AMY2A /// AMY2B	86,8	P	NM_004038	Hs.274376
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	28,1	A	N21019	Hs.154654
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	1128,1	P	AU154504	Hs.154654
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	2862,8	P	AU144855	Hs.154654
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	3465,1	P	NM_000104	Hs.154654
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	103,2	P	AU158137	Hs.296741
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	10,1	A	AK023697	Hs.296741
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	33,4	A	NM_000767	Hs.1360
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	120,1	A	X06399	Hs.1360
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	387	P	NM_017460	Hs.178738
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	88,3	A	AF182273	Hs.178738
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	23,9	A	NM_000776	Hs.329704
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	22,8	A	J04449	Hs.329704
CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	85,2	A	AV650252	Hs.178738
DPP4	dipeptidylpeptidase 4 (CD26)	432,7	M	M80536	Hs.44926
DPP4	dipeptidylpeptidase 4 (CD26)	1266,1	P	NM_001935	Hs.44926
DPP4	dipeptidylpeptidase 4 (CD26)	485	P	M74777	Hs.44926
DPP4	dipeptidylpeptidase 4 (CD26)	28,2	A	AI092511	Hs.134533
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	67926,3	P	AFFX-HUMGAPDH/M33197_5	---
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	63466,1	P	AFFX-HUMGAPDH/M33197_M	---
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	63350,1	P	AFFX-HUMGAPDH/M33197_3	---
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	58892,7	P	BE561479	Hs.169476
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	61535,8	P	BF689355	Hs.169476
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	61565,1	P	AK026525	Hs.169476
GATA4	GATA binding protein 4	26,5	A	AV700724	Hs.243987
GATA4	GATA binding protein 4	68,7	A	BF448729	Hs.243987
GATA4	GATA binding protein 4	51,2	A	AW181962	Hs.194114
GATA4	GATA binding protein 4	128,6	A	D78260	Hs.243987
GATA4	GATA binding protein 4	96	A	AL137360	Hs.311250
GATA4	GATA binding protein 4	120,9	A	BC033672	Hs.243987
GYS2	glycogen synthase 2 (liver)	6,9	A	S70004	Hs.82614
TCF1	hepatic nuclear factor (HNF1), albumin proximal factor	210,3	A	M57732	Hs.73888
TCF1	hepatic nuclear factor (HNF1), albumin proximal factor	26,9	A	X71347	Hs.73888
FOXA2	forkhead box A2, (HNF3B)	24	A	AB028021	Hs.155651
FOXA2	forkhead box A2, (HNF3B)	123,1	A	AI693985	Hs.155651

Gen	Bezeichnung	USSC T ₀	mRNA Sequenz Nummer	Uni-Gene Gruppe	
FOXA2	forkhead box A2, (HNF3B)	13,5	A	AB028021	Hs.155651
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	25,3	A	X16323	Hs.809
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	216,5	A	M60718	Hs.809
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	29,6	A	U46010	Hs.809
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	5,5	A	M77227	Hs.809
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	14,3	A	M77227	Hs.809
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	226,5	A	NM_000457	Hs.54424
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	11	A	X87870	Hs.54424
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	135,1	A	X87870	Hs.54424
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	115,6	A	Z49825	Hs.54424
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	22,4	A	AI032108	Hs.54424
INS	insulin	9,6	A	NM_000207	Hs.89832
ISL1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1)	68,6	A	NM_002202	Hs.505
KRT8	keratin 8	218,3	P	U76549	--- /// Hs.242463
KRT18	keratin 18	2215,3	P	NM_000224	Hs.65114
KRT19	keratin 19	4,1	A	NM_002276	Hs.182265
KRT19	Keratin 19	7,6	A	AW662246	Hs.182265
NEUROD1	neurogenic differentiation 1	58,2	A	NM_002500	Hs.72981
NEUROD1	neurogenic differentiation 1	144,8	A	CA778002	Hs.407438
NKX6-1	NK6 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	83,9	A	NM_006168	Hs.248151
PAX4	paired box gene 4	63,2	A	NM_006193	Hs.129706
PAX4	paired box gene 4	28,4	A	AB008913	Hs.129706
IPF1	insulin promoter factor 1, (PDX-1)	20,6	A	NM_013311	Hs.248085
IPF1	insulin promoter factor 1, (PDX-1)	22,5	A	U35632	Hs.32938
IPF1	insulin promoter factor 1, (PDX-1)	14,1	A	U30329	Hs.32938

3.2.2.1 Differenzierung durch Faktoren

Die Auswahl der Faktoren zur Differenzierung erfolgte aufgrund einiger Veröffentlichungen die sich mit der Embryonalentwicklung von Leber und Pankreas beschäftigen. Zudem wurden Faktoren aus Arbeiten ausgewählt in denen endodermale Differenzierung in anderen Stammzellen, wie embryonale Stammzellen der Maus, MAPC in Nagern und Menschen oder organspezifische Vorläuferzellen induziert wurden (vgl. Einleitung). Die Protokolle wurden teilweise aus den Arbeiten übernommen, aber auch neue Kombinationen der Faktoren ausgetestet. Zum Einsatz kamen verschiedene Medien wie: Knockout DMEM (high Glucose), DMEM (low Glucose), Myelocult H5100 und IMEM mit jeweils unterschiedlichen FCS Konzentrationen, mit Serumersatz (KO-SR) oder gänzlich ohne Serum. Supplemente wie N2, B27 und Insulin/Transferrin/Sodium Selenit (ITS), Matrices wie Fibronectin, Laminin und Matrigel in verschiedenen Konzentrationen, sowie zusätzliche Faktoren wie Leberextrakt, Nikotinamid, Dexamethason und Retinolsäure wurden mit Wachstumsfaktoren kombiniert getestet. Dabei standen folgende Zytokine zur Auswahl:

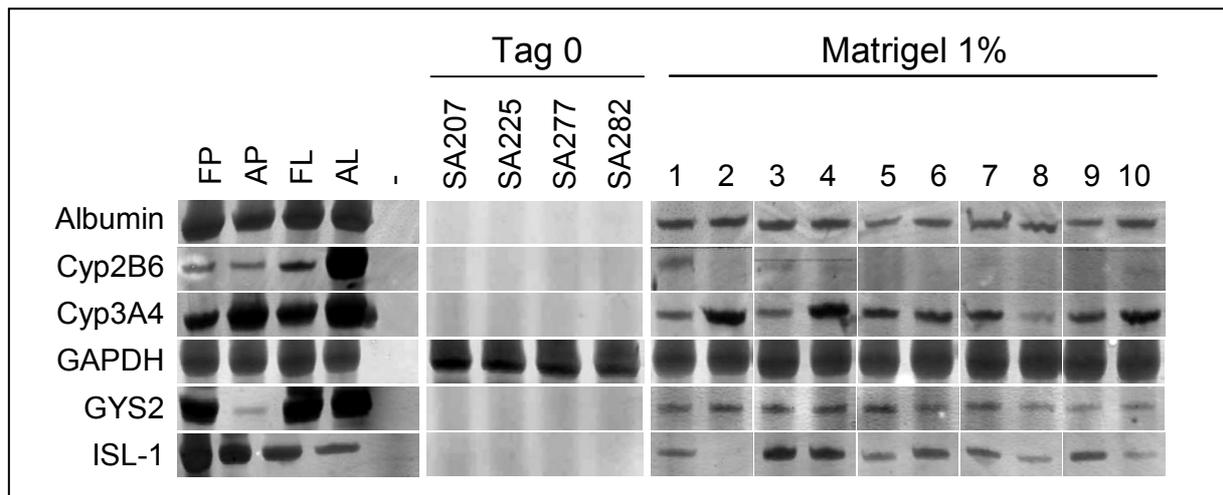
hepatocyte growth factor (HGF), *nerve growth factor beta* (β NGF), *fibroblast growth factor 4* (FGF-4), *fibroblast growth factor basic* (bFGF), *leukemia inhibitory growth factor* (LIF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) und Oncostatin M (OSM). Die Induktionsdauer differierte hierbei zwischen einem Tag und mehreren Wochen. Während dieser Zeit zeigten einige Gene Veränderungen in der Expression, während andere Gene niemals eine Erhöhung der Expression zeigten. Die Gene für HNF4 α , GATA4, Albumin, Nkx6.1, ISL-1, Cyp2B6, Cyp3A4 und Glys2 zeigten bei verschiedenen Faktorkombinationen eine leichte Erhöhung der Expression. Die Gene für NeuroD, HNF1, HNF3 β , PDX-1, PAX4, Insulin und alpha-Fetoprotein zeigten hingegen keinerlei Veränderung nach den Induktionen. Im Folgenden werden die erfolgreichsten Faktorkombinationen vorgestellt.

Matrigel

Das als Beschichtung oder 3D-Gelmatrix verwendbare Matrigel wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Tumor gewonnen. Es enthält verschiedene Wachstumsfaktoren, sowie Komponenten der extrazellulären Matrix.

In dieser Induktion wurde mit Zellpools gearbeitet. Jeweils zwei Zelllinien der 3. und 6. Passage wurden zusammen ausgesät und analysiert. Alle Zellen waren auf einer zuvor mit Matrigel beschichteten Zellkulturschale ausgesät worden (Schwartz *et al.* 2002). Hierbei wuchsen auch die Kontrollzellen, welche nicht behandelt wurden, auf der Matrigel Beschichtung. Den anderen Zellen wurden zusätzlich verschiedene Supplemente und Wachstumsfaktoren zugesetzt. Nach der RT-PCR zeigte sich allerdings auch in den vermeintlich nicht-induzierten Zellen eine Veränderung der Genexpression von Albumin, Cyp2B6, Cyp3A4, Gys2 und ISL-1. Zur Kontrolle wurden die für die Pools verwendeten Zellen erneut untersucht, ohne dass sie jemals mit Matrigel in Berührung gekommen waren. Diesmal war die RT-PCR außer der GAPDH Kontrolle für alle Gene negativ.

Hier zeigte sich, dass Matrigel alleine in der Lage ist, die Zellen in endodermaler Richtung zu differenzieren und dass die Gabe zusätzlicher Faktoren in diesem Fall keine weitere Veränderung brachte. In den Proben mit Faktoren-Zugabe waren keine weiteren Gene als in der „Matrigel-Kontrolle“ positiv. In Abbildung 3.9 sind einige Faktorkombinationen mit Matrigel Beschichtung wiedergeben.



Nr.	Zelle	Medium	FCS	Zusatz	Faktoren	Matrigel	Zeit
1	SA207 P.6 + SA225 P.6	DMEM	5%	-	-	1%	3 Wochen
2	SA277 P.3 + SA282 P.3	DMEM	5%	-	-	1%	3 Wochen
3	SA207 P.6 + SA225 P.6	DMEM	-	B27 / N2	-	1%	3 Wochen
4	SA277 P.3 + SA282 P.3	DMEM	-	B27 / N2	-	1%	3 Wochen
5	SA207 P.6 + SA225 P.6	DMEM	-	B27 / N2	FGF4 [25ng/ml]	1%	3 Wochen
6	SA277 P.3 + SA282 P.3	DMEM	-	B27 / N2	FGF4 [25ng/ml]	1%	3 Wochen
7	SA207 P.6 + SA225 P.6	DMEM	-	B27 / N2	HGF/FGF4 [je10ng/ml] + Dexa10 ⁻⁶	1%	3 Wochen
8	SA277 P.3 + SA282 P.3	DMEM	-	B27 / N2	HGF/FGF4 [je10ng/ml] + Dexa10 ⁻⁶	1%	3 Wochen
9	SA207 P.6 + SA225 P.6	DMEM	-	B27 / N2	HGF / bmp2 [je10ng/ml]	1%	3 Wochen
10	SA277 P.3 + SA282 P.3	DMEM	-	B27 / N2	HGF / bmp2 [je10ng/ml]	1%	3 Wochen

Abbildung 3.9: PAGE/Silber. Induktion mit Matrigel Beschichtung und zusätzlichen Faktoren. Matrigel induzierte die Zellen bereits alleine. Die RT-PCR war negativ für: PAX4, PDX-1, HNF1, HNF3b, Insulin, α -Feto und NeuroD. In der Tabelle sind die genauen Faktorenkombinationen angegeben. FP= fötale Pankreas RNA, AP= adulte Pankreas RNA, FL= fötale Leber RNA, AL= adulte Leber RNA, -= kein Template.

Oncostatin M / HGF

Eine weitere Kombination von Faktoren, die sich im Zusammenhang mit MSC als erfolgreich erwiesen hat, wurde von zwei verschiedenen Gruppen (Lee *et al.* 2004; Hong *et al.* 2005) beschrieben. In diesem Fall wurden die Zellen durch IMEM Medium mit 1x ITS Prämix, 10% FCS und 5x10⁻⁷M Dexamethason induziert. Für zwei Wochen wurde dem Medium außerdem 50ng/ml HGF zugesetzt, welches in der dritten und vierten Woche durch 50ng/ml OSM ersetzt wurde. Diese Faktorenkombination wurde auch für die USSC getestet. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Zellen im IMEM Medium mit 10% FCS und ITS Prämix, sowie im IMEM Medium mit 10%FCS, ITS Prämix, Dexamethason und vier Wochen HGF ohne OSM verhalten. Als Kontrolle wurden die Zellen in DMEM+10% FCS gehalten. Abbildung 3.10 zeigt die morphologische Veränderung der Zellen in den verschiedenen Medien.

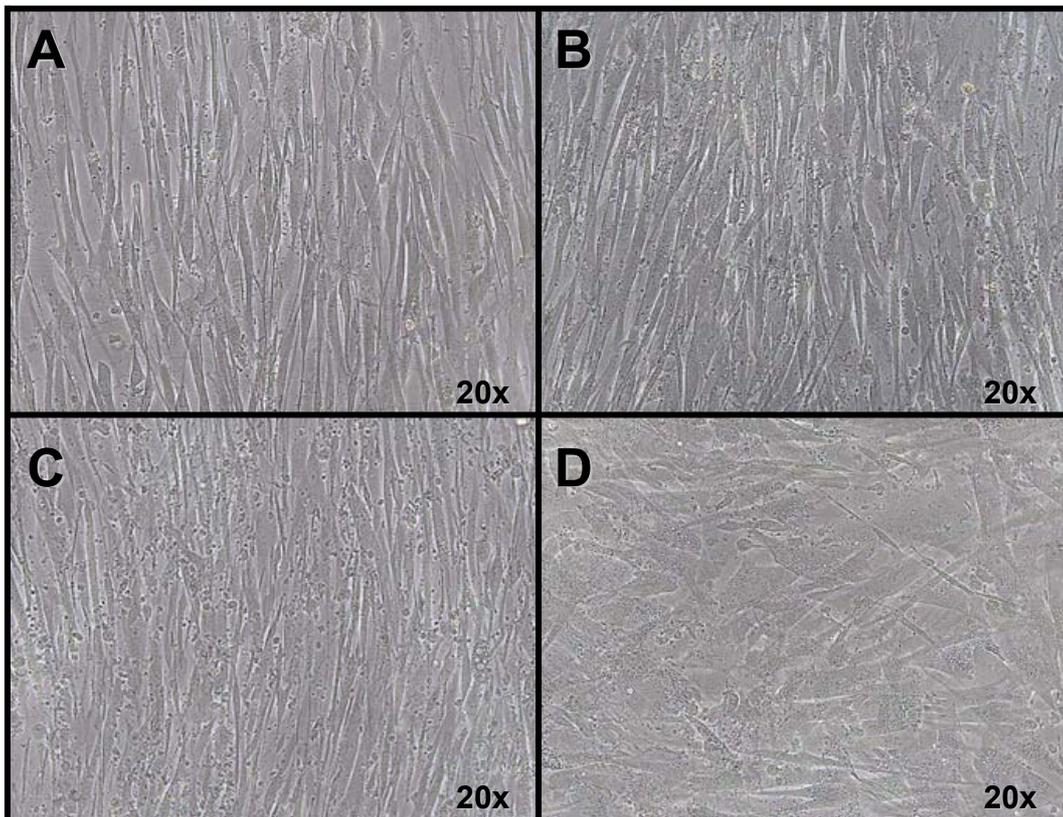


Abbildung 3.10: Lichtmikroskopische Aufnahme der USSC in verschiedenen Zusammensetzungen des Differenzierungsmediums. **A** Kontrolle in DMEM + 10% FCS, **B** IMEM + 10% FCS + ITS, **C** IMEM + 10% FCS + ITS + Dexamethason + HGF, **D** IMEM + 10% FCS + ITS + Dexamethason + HGF + OSM. Versuchsdauer 4 Wochen.

Während die Kontrollzellen länglich, spindelförmig und parallel angeordnet waren, wirkte die Morphologie der Zellen in den Differenzierungsmedien ungeordneter und granulärer. Während ohne Zugabe von HGF oder OSM eine zur Kontrolle ähnliche Morphologie erkennbar war, ging diese mit Zunahme der Faktoren stetig verloren. Besonders im vollen Differenzierungsmedium mit sowohl HGF als auch OSM hatte sich die Zellmorphologie deutlich verändert. Die Zellen waren hier bauchig bis Trapezförmig und enthielten viele Einschlüsse. Zudem wuchsen die Zellen nicht länger parallel sondern übereinander.

Die veränderten Zellen wurden mit PAS gefärbt, um Polysaccharide bzw. glykolhaltige Zellelemente nachzuweisen. Zu den glykolhaltigen Elementen zählt auch Glykogen, welches von Hepatozyten produziert wird. Als Negativkontrolle wurden die Zellen aus Kontrollansätzen mit DMEM + 10% FCS gefärbt, als Positivkontrolle wurde die humane Leberkarzinom Zelllinie HepG2 verwendet. Im Vergleich zur HepG2 enthielten undifferenzierte USSC kein Glykogen. Die nach

Behandlung mit Differenzierungsmedium und HGF/OSM differenzierten USSC wiesen jedoch glykolhaltige Komponenten auf (Abb.3.11). In der 100fachen Vergrößerung der Zellen konnte man die pinkfarbenen Komponenten gut erkennen. Die Granula fanden sich sowohl in der Positivkontrolle als auch in den differenzierten USSC wieder.

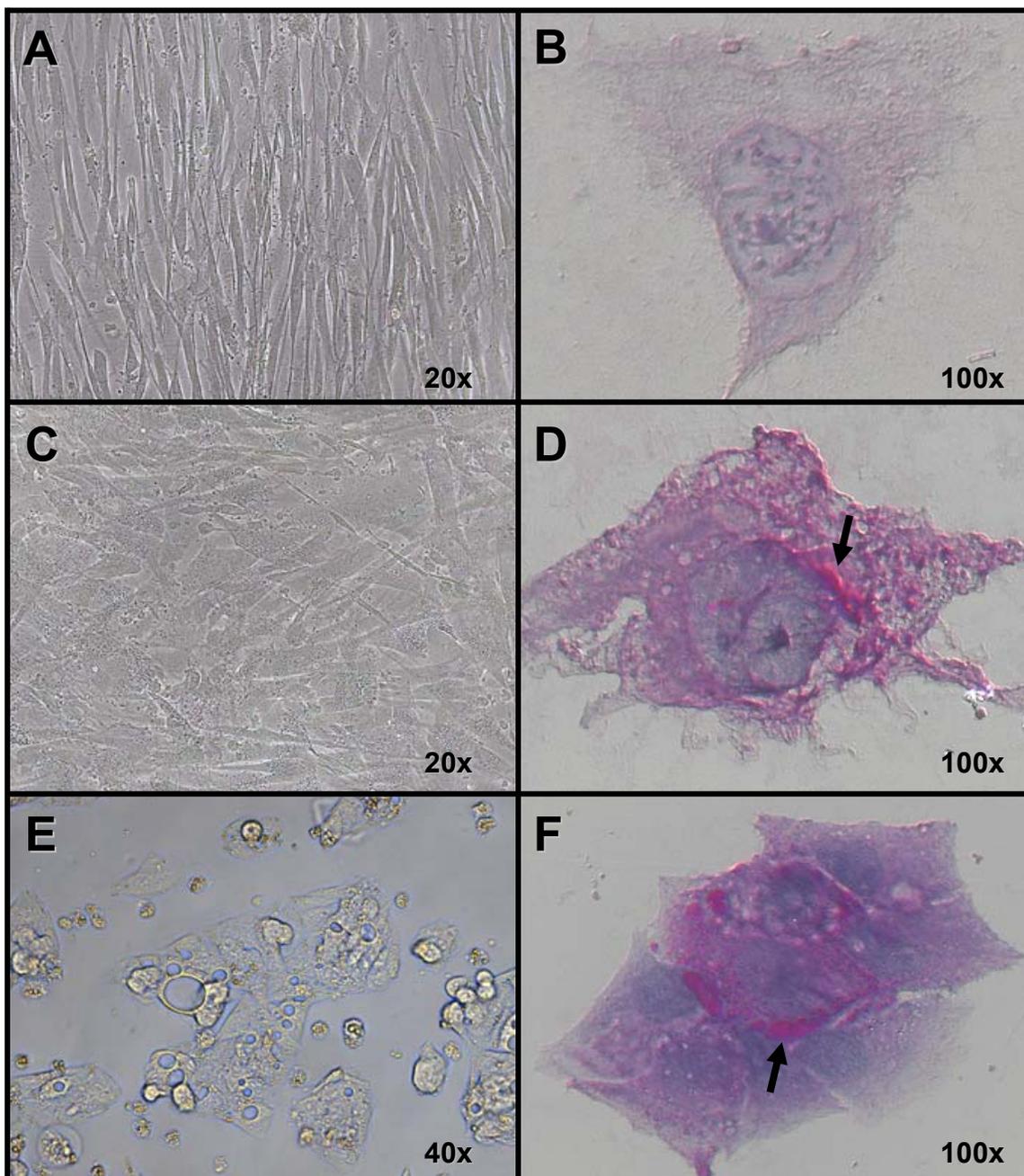
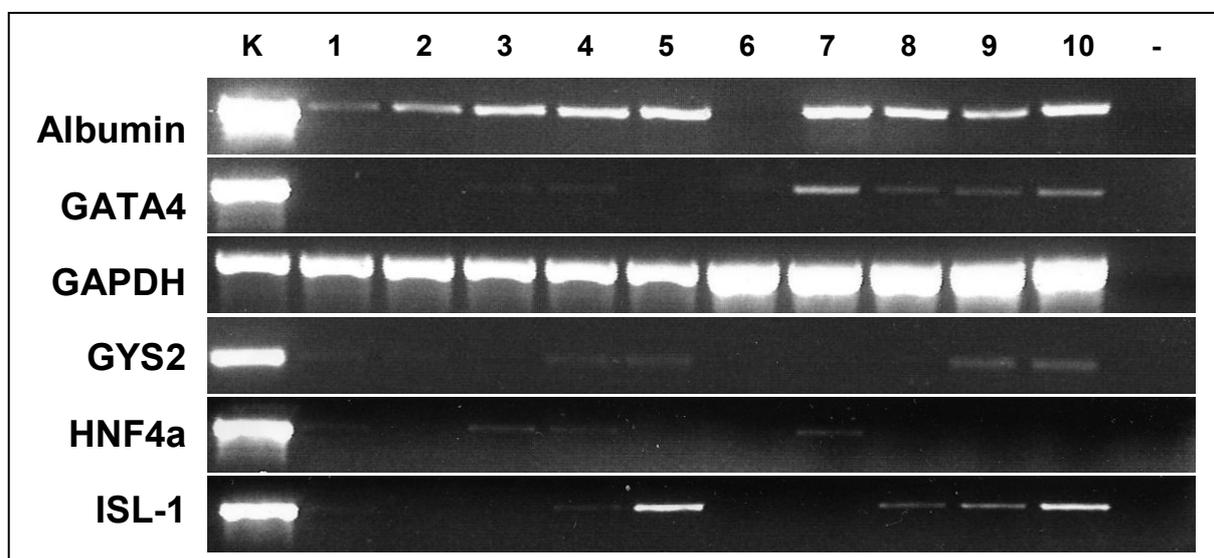


Abbildung 3.11: Lichtmikroskopische Aufnahme der **A** undifferenzierten USSC Kontrolle in DMEM + 10%FCS, **B** PAS-Färbung von [A], **C** differenzierten USSC (HGF/OSM), **D** PAS-Färbung von [C], **E** HepG2 Zellen in RPMI + 10% FCS, **F** PAS-Färbung von [E]. Die Pfeile markieren glykolhaltige Zellkomponenten (pink).

Die mit den gleichen Zellen ausgeführte RT-PCR für zwei verschiedene Zelllinien (SA5/03 und SA325 in der jeweils 8. Passage) ergab eine Zunahme der Expression von Albumin, GATA4, Gys2, HNF4a und ISL-1 (Abb.3.12). Albumin war bei manchen Zelllinien (wie z.B. bei SA5/03) bereits in der Kontrolle leicht positiv, durch die Differenzierung erhöhte sich die Expression jedoch zusätzlich. GATA4, HNF4a und Gys2 waren nur leicht erhöht. Gys2 ist das Gen für die Glykogen-Synthase und konnte in den Ansätzen mit HGF bzw. HGF/OSM nachgewiesen werden. Das Enzym ist notwendig, um Glykogen zu synthetisieren und bestätigte somit den Nachweis von Glykogen in der PAS Färbung (Abb.3.11). Besonders auffällig war auch die Zunahme der ISL-1 Expression, je faktorreicher das Differenzierungsmedium war.

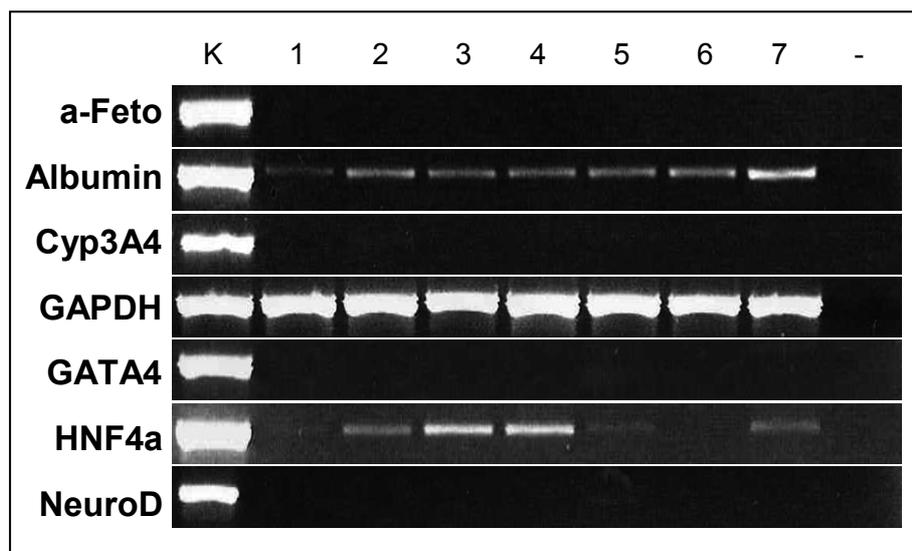


Nr.	Zelle	Medium	FCS	ITS	Dexa	Woche 1+2	Woche 3+4	Zeit
1	SA5/03 P. 8	Tag 0 Kontrolle						
2	SA5/03 P. 8	DMEM	10%	-	-	-	-	4 Wochen
3	SA5/03 P. 8	IMEM	10%	1x	$5 \times 10^{-7} M$	-	-	4 Wochen
4	SA5/03 P. 8	IMEM	10%	1x	$5 \times 10^{-7} M$	50 ng/ml HGF	50 ng/ml HGF	4 Wochen
5	SA5/03 P. 8	IMEM	10%	1x	$5 \times 10^{-7} M$	50 ng/ml HGF	50 ng/ml OSM	4 Wochen
6	SA325 P.8	Tag 0 Kontrolle						
7	SA325 P.8	DMEM	10%	-	-	-	-	4 Wochen
8	SA325 P.8	IMEM	10%	1x	$5 \times 10^{-7} M$	-	-	4 Wochen
9	SA325 P.8	IMEM	10%	1x	$5 \times 10^{-7} M$	50 ng/ml HGF	50 ng/ml HGF	4 Wochen
10	SA325 P.8	IMEM	10%	1x	$5 \times 10^{-7} M$	50 ng/ml HGF	50 ng/ml OSM	4 Wochen

Abbildung 3.12: Agarose/EtBr. Induktion mit speziellem Differenzierungsmedium sowie HGF und OSM. Die RT-PCR war negativ für: α -Feto, Cyp2B6, HNF1, Insulin, NeuroD, PAX4 und PDX-1. In der Tabelle sind die genauen Faktorenkombinationen angegeben. K= RNA Pool aus fötaler und adulter Pankreas RNA sowie fötaler und adulter Leber RNA, -= kein Template.

Retinolsäure

Retinolsäure wird seit langem in der embryonalen Stammzellforschung zur Differenzierung eingesetzt. Da es für die Zellen aber toxisch ist, sterben die meisten Zellen durch die Zugabe von Retinolsäure (RA) ab und nur sehr wenige differenzieren. USSC Kulturen, die in DMEM ohne FCS (Minimalmedium) gehalten wurden, überlebten die Gabe von RA nur ein bis zwei Tage. Ab dem dritten Tag befanden sich nur noch Zelltrümmer in der Kulturschale und es konnte keine RNA mehr isoliert werden. Wurde dem Medium jedoch FCS zugesetzt, verbesserte sich die Viabilität der Zellen. Hier konnte nach einer Woche noch RNA gewonnen werden, wenn auch die Zellen in den RA Ansätzen einen optisch schlechten Eindruck vermittelten. In der RT-PCR zeigte sich, dass sich die Expression von Albumin durch Retinolsäure leicht erhöht war. Das stärkste Signal zeigte sich im Minimalmedium ohne FCS mit Retinolsäure-Behandlung nach einem Tag. Die Expression von HNF4a erhöhte sich deutlich durch die Retinolsäure (Abb.3.13).



Nr.	Zelle	Medium	FCS	Retinolsäure	Zeit
1	SA4/146 P.5	Tag 0 Kontrolle			
2	SA4/146 P.5	DMEM	30%	-	7 Tage
3	SA4/146 P.5	DMEM	30%	10 µM / Tag	1 Tag
4	SA4/146 P.5	DMEM	30%	10 µM / Tag	3 Tage
5	SA4/146 P.5	DMEM	30%	10 µM / Tag	7 Tage
6	SA4/146 P.5	DMEM	-	-	7 Tage
7	SA4/146 P.5	DMEM	-	10 µM / Tag	1 Tag

Abbildung 3.13: Agarose/EtBr. Induktion mit Retinolsäure. In der Tabelle sind die genauen Spezifikationen angegeben. K= RNA Pool aus fötaler und adulter Pankreas RNA sowie fötaler und adulter Leber RNA, -= kein Template.

3.2.2.2 Cokulturen

Eine weitere Möglichkeit der Differenzierung war die Cokultivierung von Stammzellen mit Zellen endodermalen Ursprungs. Die eingesetzten Leber- oder Pankreaszellen sezernierten in diesem Modell spezielle Faktoren in das umgebende Kultivierungsmedium, welche die Stammzellen zur Differenzieren anregen sollten. Die Faktorausschüttung von bestimmten Geweben ist aus der Embryonalentwicklung bekannt (z.B. aus dem Herzmesoderm und dem Septum Transversum Mesenchym). Für die Cokultivierung standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum einen ließen sich primäre Hepatozyten einsetzen, die im Labor entweder frisch isoliert oder kryokonserviert gekauft werden konnten. Zum anderen konnte Tiergewebe oder eine Gewebebiopsie des Menschen verwendet werden. Die endodermalen Zellen konnten zusammen mit den Stammzellen kultiviert werden, so dass ein Zell/Zell Kontakt möglich war oder sie wurden durch eine permeable Membran räumlich voneinander getrennt (Jang *et al.* 2004). Die Membran hatte eine festgelegte Porengröße durch die nur sehr kleine Moleküle, wie zum Beispiel Proteine diffundieren konnten. Damit war der Austausch von Nährstoffen und speziellen Faktoren über das Medium gewährleistet, die Zellen hatten jedoch in diesem so genannten Transwell-System keinen Kontakt zueinander. Des Weiteren wurden die endodermalen Zellen separat vorkultiviert und das so konditionierte Medium erst zu einem späteren Zeitpunkt zu den Stammzellen gegeben. Diese Methode hatte unter anderem den Vorteil, dass die sezernierten Faktoren aufkonzentriert werden konnten. Das Medium wurde vor dem Einsatz sterilfiltriert, um endodermale Zellreste zu entfernen. In dieser Arbeit wurden folgende Arten von Cokulturen angewendet:

Cokulturen mit primären Ratten-Hepatozyten

Für die Cokultur mit Primärzellen wurden kryokonservierte Ratten-Hepatozyten (rHeps) eingesetzt. Ausplattierte Ratten-Hepatozyten benötigen Collagen als Matrix und wurden auf unbehandelten Zellkulturschalen nicht adhärent. Wurden zunächst die USSC ausplattiert, so benutzten die rHeps die Stammzellen als Feederlayer und setzten sich auf diesen fest. Die Hepatozyten erschienen im Mikroskop bräunlich und behielten auch attachiert ihre runde Morphologie. Somit ließen sie sich optisch gut von den USSC unterscheiden.

Die Ratten-Hepatozyten wurden mit den USSC zum einen über Zell/Zell Kontakt (direkte Cokultur) kultiviert, zum anderen getrennt über eine 1µm Poren Membran (Transwell). Beim Transwell System wurden die rHeps im oberen Teil, auf der

Membran und die USSC im unteren Kompartiment (6-Well Platte) ausgesät. Bei der direkten Cokultur wurden beide Zelltypen auf einer 100mm Zellkulturschale, wie in Abb.3.15 dargestellt, ausgesät.

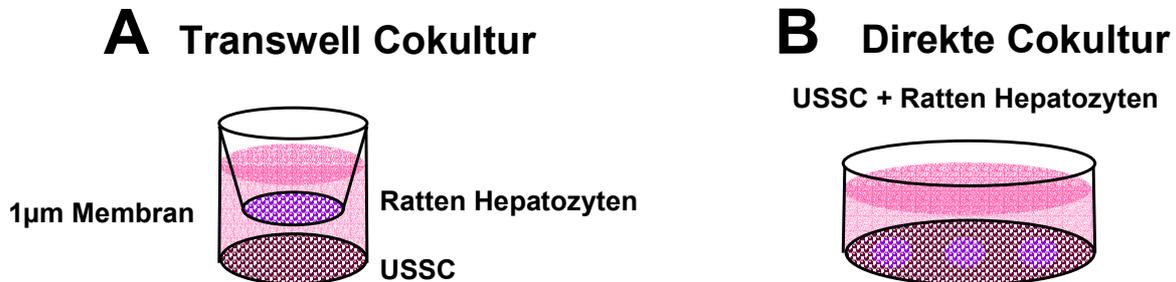


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Cokultur von USSC mit Ratten-Hepatozyten über **A** ein Transwell-System, bei dem die Zellen über eine 1µm-Poren-Membran voneinander getrennt sind und **B** die direkte Cokultur beider Zelltypen mit Zell/Zell Kontakt.

Die Kultivierung erfolgte in verschiedenen Medien über einen Zeitraum von einem Tag bis zu sechs Wochen. Es wurde zu dem verwendeten DMEM + 10% FCS Medium ein weiteres, Hepatozyten unterstützendes Medium eingesetzt. Das „*hepatocyte culture medium*“ (HCM) enthält essentielle Faktoren für die Leberzellen und wird für die Kultivierung von rHeps empfohlen. Im Versuch wurden die USSC mit beiden Medien einzeln und in Cokultur mit den Hepatozyten gehalten.

Bei Kultivierung der USSC in DMEM + 10% FCS zeigten diese ihre normale spindelförmige Morphologie. Durch die Cokultivierung mit den Ratten-Hepatozyten traten zusätzlich kleine runde bis dreieckige Zellen auf, welche wie eine Querverbindung zwischen den spindelförmigen Zellen lagen. Im HCM Medium dagegen waren die USSC nicht mehr spindelförmig. Sie verbreiterten sich stark, so dass die Zellen größer und faseriger erschienen.

Durch die Cokultur mit rHeps veränderten sich die USSC nur leicht. An der Kontaktstelle zu den rHeps verzweigten sich die Stammzellen. Die rHeps waren als bräunliche, runde Zellen im Gegensatz zu den farblosen USSC gut zu erkennen (Abb.3.16).

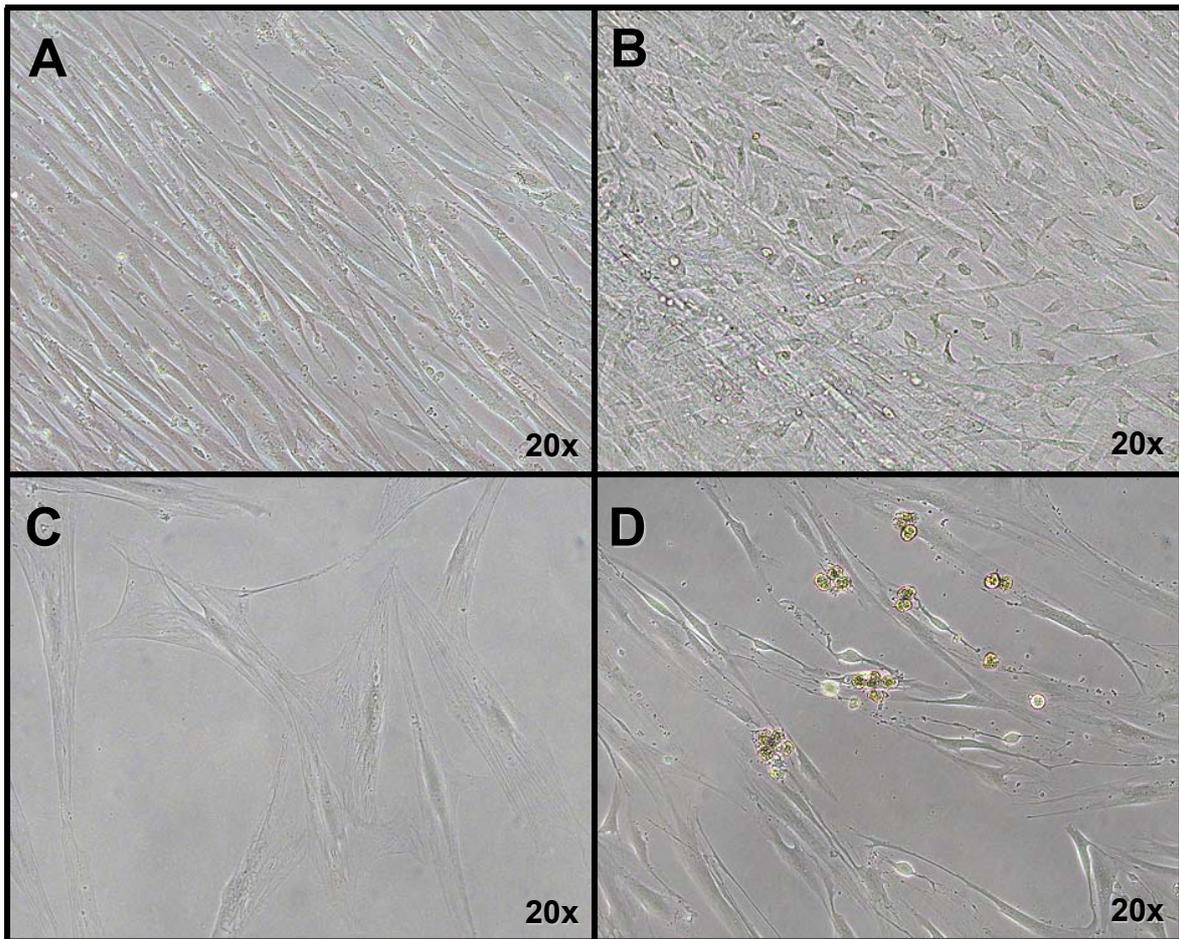
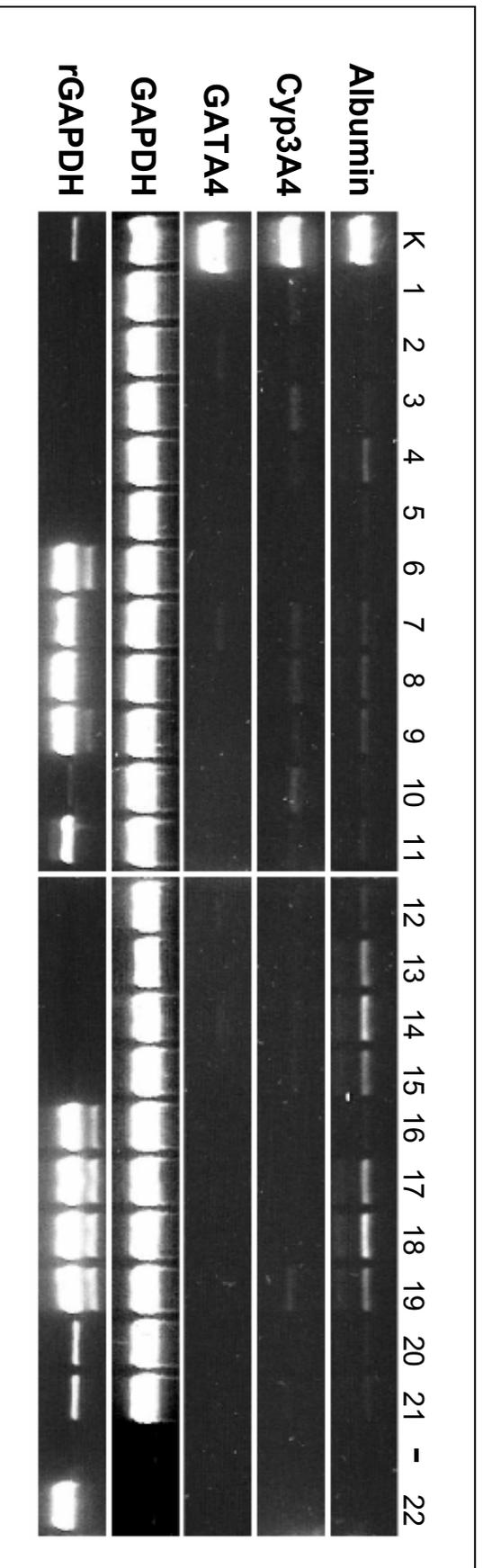


Abbildung 3.16: Lichtmikroskopische Aufnahme der USSC mit direkter Cokultivierung der Ratten Hepatozyten nach sechs Wochen. **A** USSC alleine in DMEM+10%FCS, **B** USSC mit rHeps in DMEM+10%FCS, **C** USSC alleine in HCM, **D** USSC mit rHeps in HCM.

Die direkte Cokultivierung konnte nur eingesetzt werden, wenn sichergestellt war, dass die Primer der RT-PCR nicht mit den Rattenzellen kreuzreaktiv sind. Nur einer der in dieser Arbeit erstellten Primer (HNF1) reagierte mit der Ratten RNA und wurde für die Analyse der Cokultur nicht verwendet. Da die GAPDH Kontrolle human-spezifisch war, wurde ein zusätzlicher rattenspezifischer GAPDH Primer (rGAPDH) als Kontrolle etabliert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Veränderung der USSC durch die Cokultivierung mittels RT-PCR dokumentiert (Abb. 3.17). In diesem Experiment konnte eine Steigerung der Expression von Albumin, Cyp3A4 und GATA4 beobachtet werden. Besonders auffällig war, dass die USSC in HCM sowohl alleine, als auch in Kombination mit den rHeps, eine deutlich erhöhte Albumin Expression aufwiesen.



Nr.	Zelle	rHeps	Cokultur	Medium	Zeit
1			Tag 0 Kontrolle		
2	SA5/03 P. 8	-	-	DMEM+10%	Tag 1
3	SA5/03 P. 8	-	-	DMEM+10%	Woche 1
4	SA5/03 P. 8	-	-	DMEM+10%	Woche 3
5	SA5/03 P. 8	-	-	DMEM+10%	Woche 6
6	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	DMEM+10%	Tag 1
7	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	DMEM+10%	Woche 1
8	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	DMEM+10%	Woche 3
9	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	DMEM+10%	Woche 6
10	SA5/03 P. 8	rHeps	Transwell	DMEM+10%	Woche 3
11	SA5/03 P. 8	rHeps	Transwell	DMEM+10%	Woche 6

Nr.	Zelle	rHeps	Cokultur	Medium	Zeit
12	SA5/03 P. 8	-	-	HCM	Tag 1
13	SA5/03 P. 8	-	-	HCM	Woche 1
14	SA5/03 P. 8	-	-	HCM	Woche 3
15	SA5/03 P. 8	-	-	HCM	Woche 6
16	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	HCM	Tag 1
17	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	HCM	Woche 1
18	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	HCM	Woche 3
19	SA5/03 P. 8	rHeps	direkt	HCM	Woche 6
20	SA5/03 P. 8	rHeps	Transwell	HCM	Woche 3
21	SA5/03 P. 8	rHeps	Transwell	HCM	Woche 6
22			Ratten Hepatozyten		

Abbildung 3.17: Agarose/EtBr. Die Expression von Albumin, Cyp3A4 und GATA4 ist erhöht. Die Albumin Expression erhöht sich besonders in HCM Medium nach 1-6 Wochen, auch ohne rHeps. Auffällig ist die Expression von rHeps in den Transwells. Hier befand sich offensichtlich Ratten RNA im unteren Kompartiment. K=Gepoote RNA von adultem und fötalem Pankreas und Lebergewebe, -= kein Template.

Gegenüber der Expression an Tag 0 und Tag 1 war ein deutlicher Anstieg von Albumin in der RT-PCR in der Woche 1, 3 und 6 zu erkennen. In den Transwell-Ansätzen war die Albumin Expression jedoch nicht stark verändert. Dafür zeigte sich hier, dass die Trennung der Zellen durch die 1µm-Membran nicht optimal verlaufen war. In der Ratten-GAPDH-Amplifikation traten auch in den Transwell-Proben Banden auf. Dies wies darauf hin, dass sich im unteren Kompartiment Ratten-RNA befunden haben muss. Da die Primer jedoch nicht kreuzreaktiv waren, wurde das Expressionsmuster nicht verfälscht. Die Gene für α -Feto, Cyp2B6, HNF3b, HNF4a, Insulin, NeuroD, Nkx6.1, PAX4 und PDX-1 wurden nicht exprimiert.

Die Cokulturen von USSC mit Ratten Hepatozyten wurden durch zusätzliche Faktoren erweitert, was allerdings keine weitere Differenzierung der Stammzellen zur Folge hatte. Die Beschichtung mit Collagen I (empfohlen für die Ratten-Hepatozyten-Kultur) brachte keinerlei Verbesserung. Auch die Bildung von dreidimensionalen USSC-Sphären durch „hanging drop“ Kultur war nicht erfolgreich, da sich die Sphären in den Zellkulturschalen wieder zu einem adhären Monolayer auflösten. Die Vorbehandlung der Hepatozyten mit Staurosporin (Apoptose-induzierendes Agents) sollte als „injury model“ dienen. Hierbei sollten die geschädigten Zellen durch die induzierte Apoptose andere Signalfaktoren aussenden, die zur Differenzierung der Stammzellen führen sollten. Allerdings ergab sich auch hier keine signifikante Änderung der endodermalen Genexpression.

Cokulturen mit Leber- und Pankreasgewebe vom Schaf

Aus dem *in utero* Modell war bekannt, dass sich die USSC im Schaf in Albumin-produzierende Zellen differenzieren lassen. Aus diesem Grund wurde die Cokultur mit Schafgewebe durchgeführt. Ähnlich wie bei der Cokultur mit primären Ratten-Hepatozyten wurde auch hier die direkte Cokultur, wie das Transwell-System verwendet. Zusätzlich wurde mit konditioniertem Medium (CM) gearbeitet, in dem das Gewebe zunächst in Zellkulturmedium inkubiert und das so angereicherte Medium erst später zu den Stammzellen gegeben wurde (Abb.3.18).

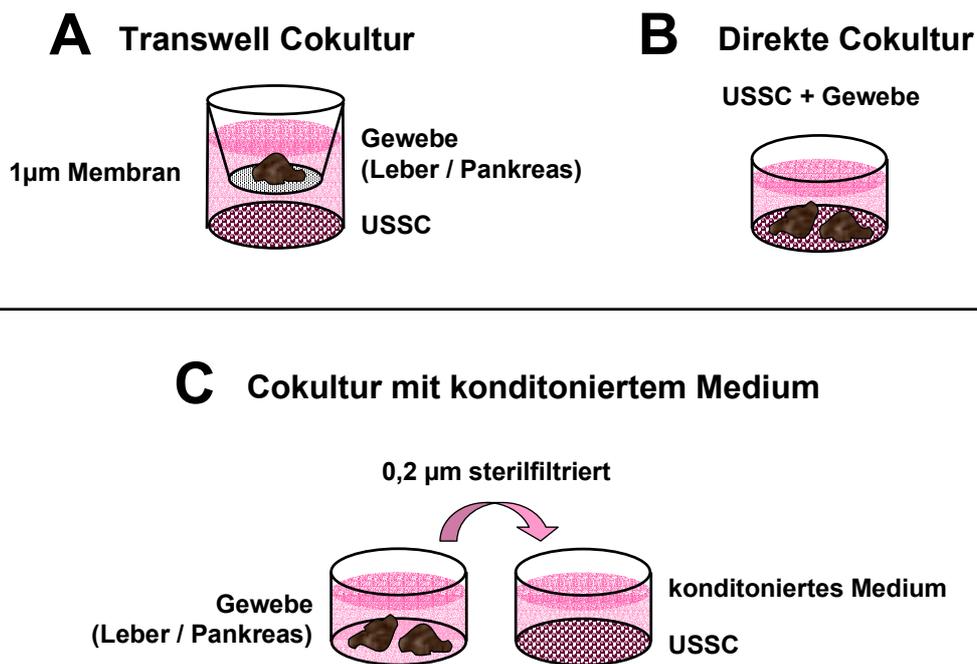


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Cokultur von USSC mit Schafgewebe über **A** ein Transwell-System, bei dem die Zellen über eine 1µm-Poren-Membran voneinander getrennt sind, **B** die direkte Cokultur beider Zelltypen mit Zell/Zell Kontakt und **C** mit konditioniertem Medium.

Im Experiment wurde das Medium über zwei Wochen konditioniert und dann eingefroren. Für den Versuch wurde das gesamte konditionierte Medium aufgetaut, gepoolt und sterilfiltriert. Dann wurde es 1:1 mit frischem Medium versetzt und zu den USSC gegeben. Nach einer Woche zeigten die USSC in mit Schafleber konditioniertem DMEM + 10% FCS eine stark veränderte Morphologie. Vom rundlichen Zellkörper gingen lange, dünne Fortsätze ab, welche an neuronale Zellen oder Dendriten erinnerten (Abb.3.19).

In der RT-PCR konnten keine signifikanten Veränderungen der endodermalen Genexpression beobachtet werden. Primer zur spezifischen neuronalen Kontrollanalyse standen nicht zur Verfügung.

In einem weiteren Versuch wurde eine einmalige Dosis Retinolsäure in das konditionierte Medium gegeben. Im Zusammenhang mit ES-Zellen konnte somit eine Differenzierung in Richtung Pankreas induziert werden (Micallef *et al.* 2005). In der RT-PCR war jedoch keine Veränderung der endodermalen Genexpression zu beobachten. Die USSC wiesen in diesem Fall keine neuronale Morphologie auf.

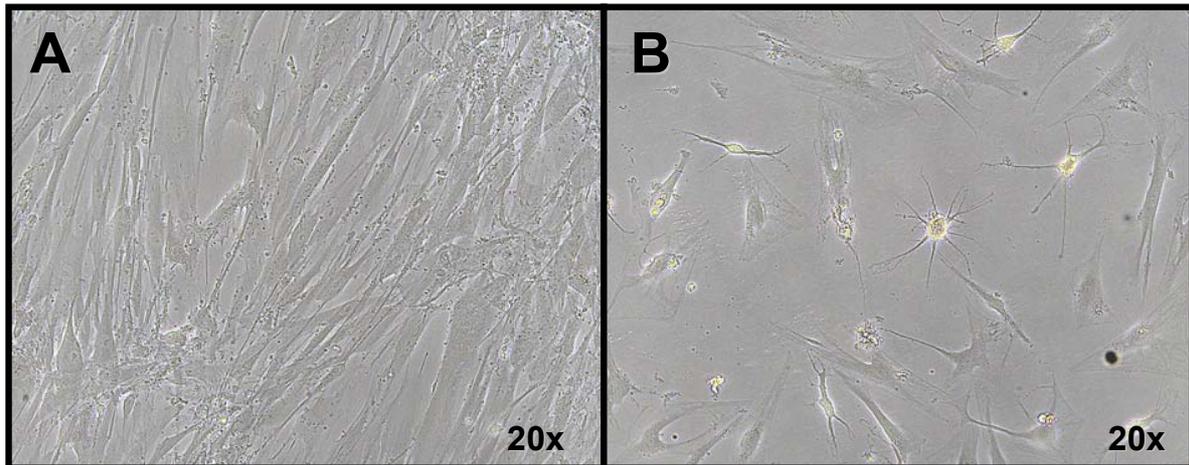


Abbildung 3.19: Lichtmikroskopische Aufnahme von **A** USSC in DMEM + 10% FCS und **B** USSC in durch Schafleber konditioniertem DMEM + 10% FCS mit neuronaler Morphologie.

Die direkte Cokultur mit frischem Gewebe erwies sich als unpraktikabel, da die Veränderung der USSC im Mikroskop durch das Gewebe schlecht verfolgt werden konnte und sich aus dem Gewebe zusätzlich Einzelzellen herauslösten. Daher wurde die Kultivierung im Transwell-System vorgezogen. Das zerkleinerte Gewebe wurde dabei wiederum im oberen und die USSC unteren Kompartiment kultiviert.

Bereits nach vier Tagen in der Cokultur verändern sich die USSC morphologisch. Bei Cokultur mit Schafleber in DMEM + 10% FCS verbreiterten sich die Zellen und hatten viele Einschlüsse. Dies war besonders gut in großer Vergrößerung zu erkennen (Abb.3.20). Bei Cokultur mit Lebergewebe in HCM hingegen waren die USSC nicht länger adhärent. Sie lösten sich von der Zellkulturschale ab und wirkten rund bis blasenförmig. Hier waren zudem einige Zelltrümmer zu erkennen.

Bei der Cokultur mit Pankreasgewebe in DMEM + 10% FCS zeigte sich eine ähnlich veränderte Morphologie wie beim Lebergewebe. Die Zellen erschienen hier noch breiter und enthielten vermehrt Einschlüsse.

Die stark veränderte Morphologie der USSC spiegelte sich jedoch nicht in der RT-PCR wieder. In der Cokultur mit Lebergewebe waren Banden für Albumin und Cyp3A4 in DMEM + 10% FCS und HCM Medium zu erkennen (Abb.3.21). Albumin zeigte nur eine leichte Erhöhung an den Tagen 4 und 8 im Gegensatz zu den Tagen 0 und 1. Cyp3A4 war in den Proben mit USSC alleine immer negativ, in den Cokulturen immer positiv. Die Expression schien dabei unabhängig vom verwendeten Medium zu sein. Die Reaktion war negativ für α -Fetoprotein, Cyp2B6, GATA4, Gys2, HNF3b, HNF4a,

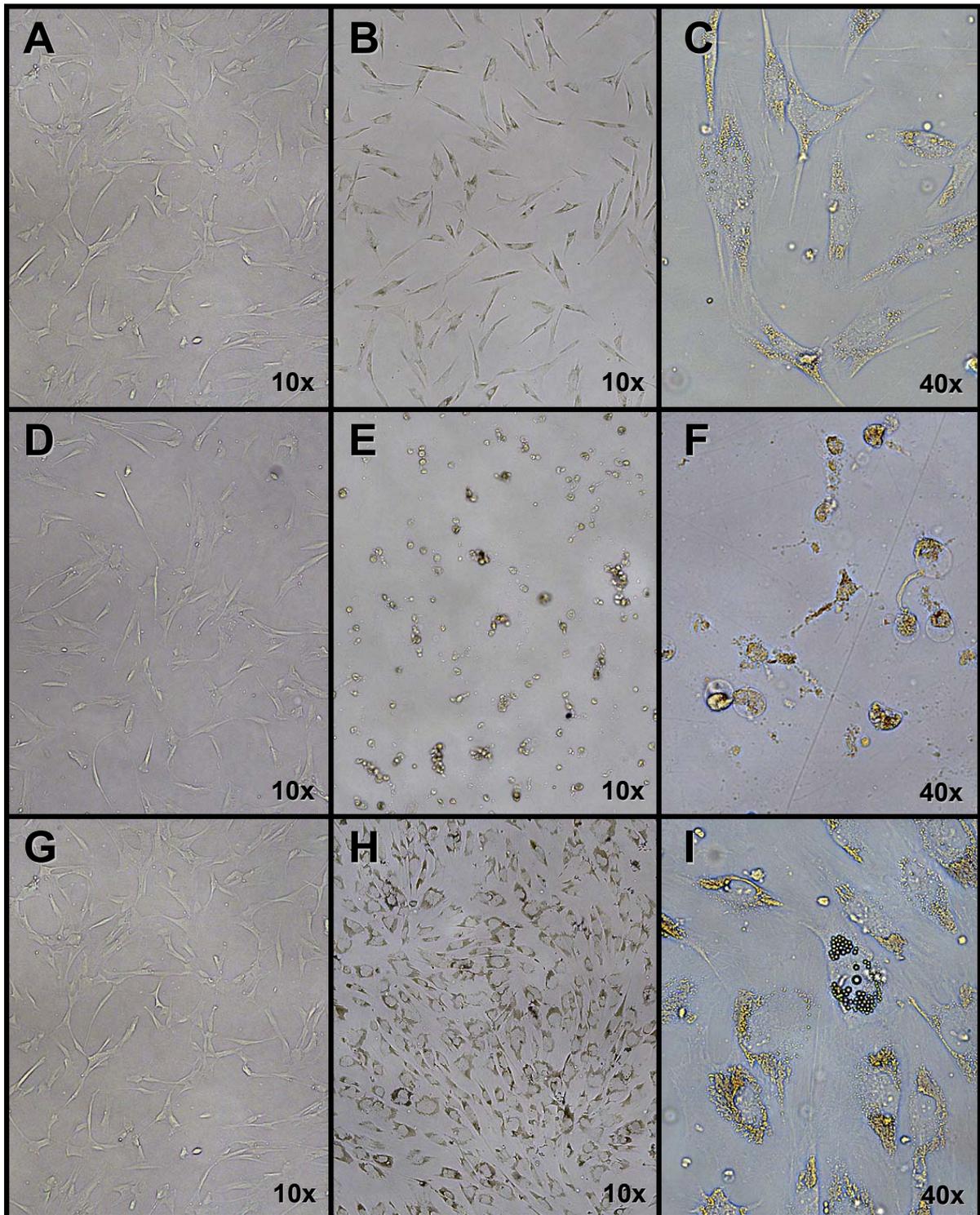
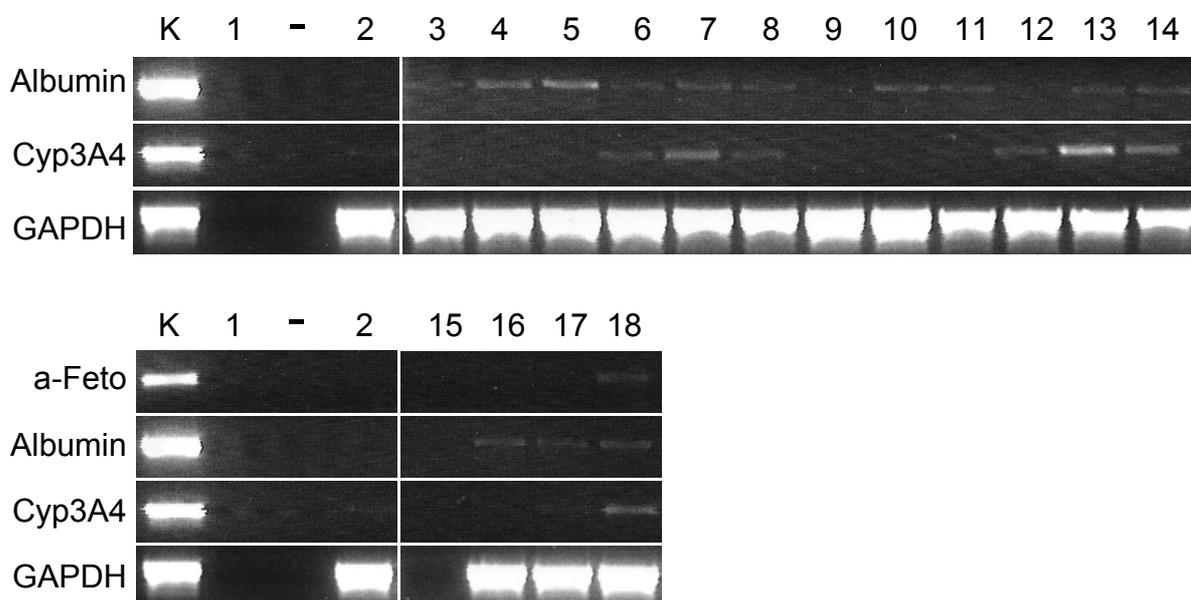


Abbildung 3.19: Lichtmikroskopische Aufnahme der Transwell-Cokultur mit Schafgewebe. **A** USMC alleine in DMEM + 10% FCS, **B** USMC mit Transwell-Leber-Cokultur in DMEM + 10% FCS, **C** vergrößerter Ausschnitt von **B**. **D** USMC alleine in HCM, **E** USMC mit Transwell-Leber-Cokultur in HCM, **F** vergrößerter Ausschnitt von **E**. **G** USMC alleine in DMEM+10%FCS, **H** USMC mit Transwell-Pankreas-Cokultur in DMEM + 10% FCS, **I** vergrößerter Ausschnitt von **H**.

Insulin, ISL-1, NeuroD, Nkx6.1, PAX4 und PDX-1. Kreuzreaktiv mit der Schaf RNA war nur HNF1. Eine separate Schaf GAPDH Kontrolle wurde nicht etabliert.

In der Cokultur mit Pankreas Gewebe konnten nur wenige Proben analysiert werden, da das Gewebe nicht aus dem Inneren des Organs entnommen werden konnte und die Proben häufig unsteril waren. Auch hohe Antibiotika und Antimykotika Konzentrationen schafften nicht immer Abhilfe. In den analysierten Proben konnte am Tag 4 neben den auch in der Leberkultur exprimierten Genen Albumin und Cyp3A4 zusätzlich α -Fetoprotein nachgewiesen werden. Alle anderen Gene waren auch hier negativ.



Nr.	Zelle	Medium	FCS	Cokultur	Dauer
1	Schaf Leber				
2	Tag 0 Kontrolle				
3	SA073 P.6	HCM	-	-	Tag 1
4	SA073 P.6	HCM	-	-	Tag 4
5	SA073 P.6	HCM	-	-	Tag 8
6	SA073 P.6	HCM	-	Leber	Tag 1
7	SA073 P.6	HCM	-	Leber	Tag 4
8	SA073 P.6	HCM	-	Leber	Tag 8
9	SA073 P.6	DMEM	10%	-	Tag 1

Nr.	Zelle	Medium	FCS	Cokultur	Dauer
10	SA073 P.6	DMEM	10%	-	Tag 4
11	SA073 P.6	DMEM	10%	-	Tag 8
12	SA073 P.6	DMEM	10%	Leber	Tag 1
13	SA073 P.6	DMEM	10%	Leber	Tag 4
14	SA073 P.6	DMEM	10%	Leber	Tag 8
15	Schaf Pankreas				
16	SA073 P.6	HCM	-	Pankreas	Tag 1
17	SA073 P.6	DMEM	10%	Pankreas	Tag 1
18	SA073 P.6	DMEM	10%	Pankreas	Tag 4

Abbildung 3.20: Agarose/EtBr. Die Expression von Albumin und Cyp3A4 ist bei Cokultivierung mit Leber und Pankreasgewebe erhöht, bei der Pankreaskultur ist zusätzlich α -Fetoprotein erhöht. K=Gepoolte RNA von adultem und fötalem Pankreas- und Lebergewebe, -= kein Template.

Cokultur mit humanem Lebergewebe aus einer Biopsie

Die humane Leberbiopsie wurde bei einer Operation eines Gallengangkarzinoms in der Chirurgischen Abteilung der Universitätskliniken Düsseldorf entnommen. Das Tumor- und Hepatitis C freie Gewebe wurde zerkleinert und für zwei Tage in DMEM + 10% FCS, bzw. HCM mit erhöhter Antibiotika und Antimykotika Konzentration vorinkubiert. Anschließend wurde das Gewebe für die Cokultivierung zusammen mit USSC in ein Transwell-System mit frischen Medien gegeben.

Die zur Vorkultivierung der Gewebe verwendeten Medien, wurden sterilfiltriert und als konditionierte Medien in eine separate USSC Kultur gegeben. Das CM wurde hier nicht eingefroren. Als Kontrolle dienten USSC in den jeweiligen frischen Medien. Die Cokultur verlief über 11 Tage.

Wie in Abbildung 3.21 zu erkennen ist, waren in der DMEM + 10% FCS Kontrolle die Zellen parallel angeordnet und spindelförmig, in HCM wiederum mit faserigen Ausläufern und die Zellkerne traten deutlich hervor. In den Transwell-Kulturen mit dem humanen Lebergewebe zeigten sich deutliche Abweichungen der Morphologie zur Kontrolle. In DMEM + 10% FCS befanden sich viele runde Zellen, die nicht adhärent waren, sowie einige Zelltrümmer. Die wenigen, noch adhären Zellen waren sehr dünn und lang gezogen. In HCM haben sich die USSC im Gegensatz zur Kontrolle verbreitert und waren stark granulär. Im Ansatz mit konditioniertem DMEM + 10% FCS Medium sahen die USSC ähnlich aus wie in den Transwell Kulturen. Es befanden sich auch hier einige Zelltrümmer und abgerundete Zellen in der Kultur, jedoch waren mehr adhären Zellen zu finden. In der Probe mit konditioniertem HCM dagegen waren kaum noch attachierte Zellen zu sehen. Es waren nur noch wenige Zellen auf der Platte zu erkennen, welche eine eher eckige Morphologie hatten und Einschlüsse enthielten.

Die Analyse der Genexpression ergab Banden für Albumin, Cyp3A4, GAT4, GYS2, HNF4a, NeuroD, Nkx6.1 und PDX-1. Die Gene α -Feto, Cyp2B6, HNF1, HNF3b, Insulin und PAX4 konnten nicht nachgewiesen werden. Abbildung 3.22 zeigt eine Albumin Expression der Kontrolle in beiden Medien, sowie in HCM Medium bei Transwell (TW) und konditioniertem Medium (CM). Bei DMEM + 10% FCS in TW und CM war nur eine leichte Expression zu erkennen. Gerade in diesen beiden Ansätzen war jedoch GATA4 stark erhöht. Sonst war nur eine schwache Bande bei HCM - CM zu erkennen.

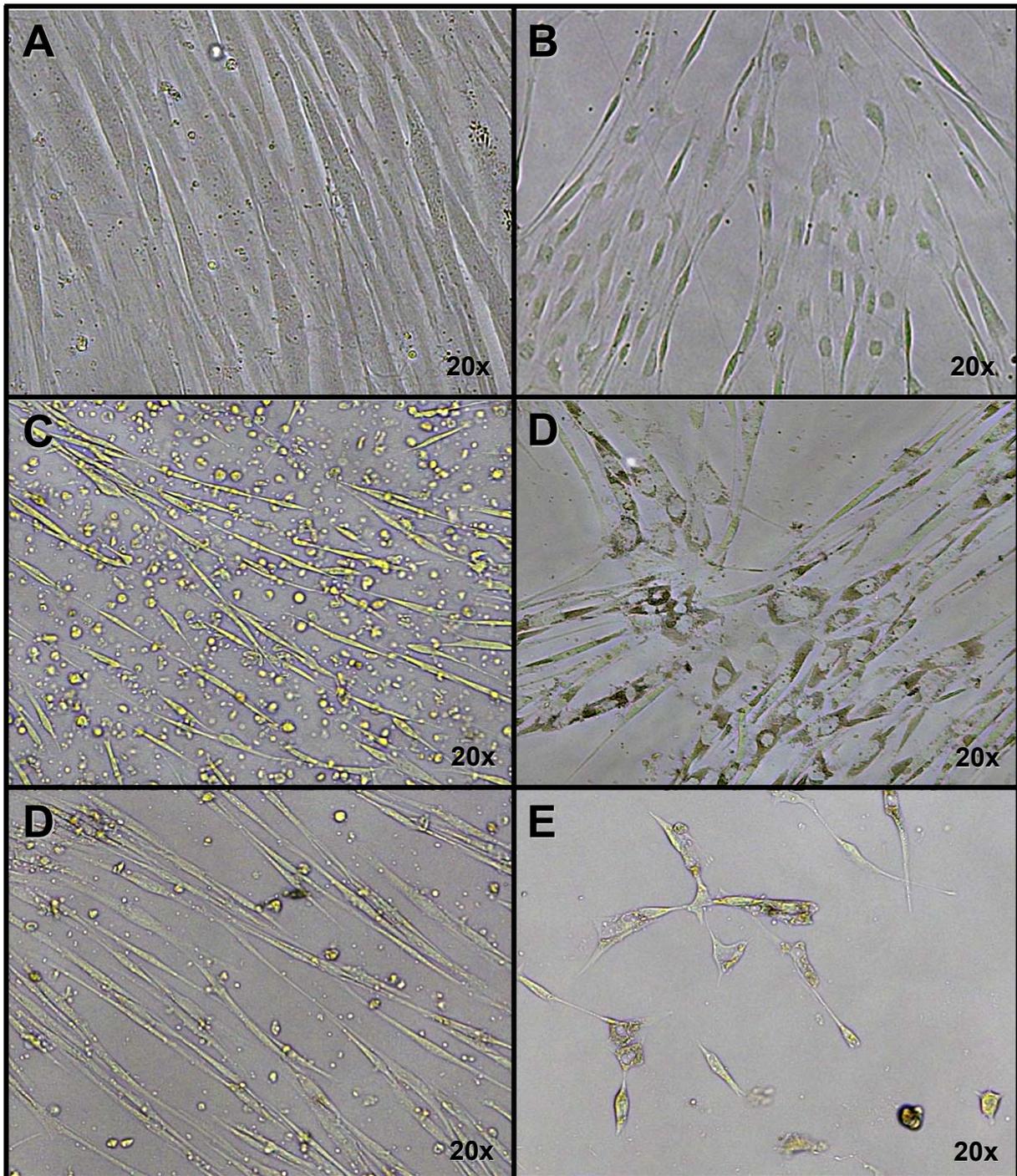
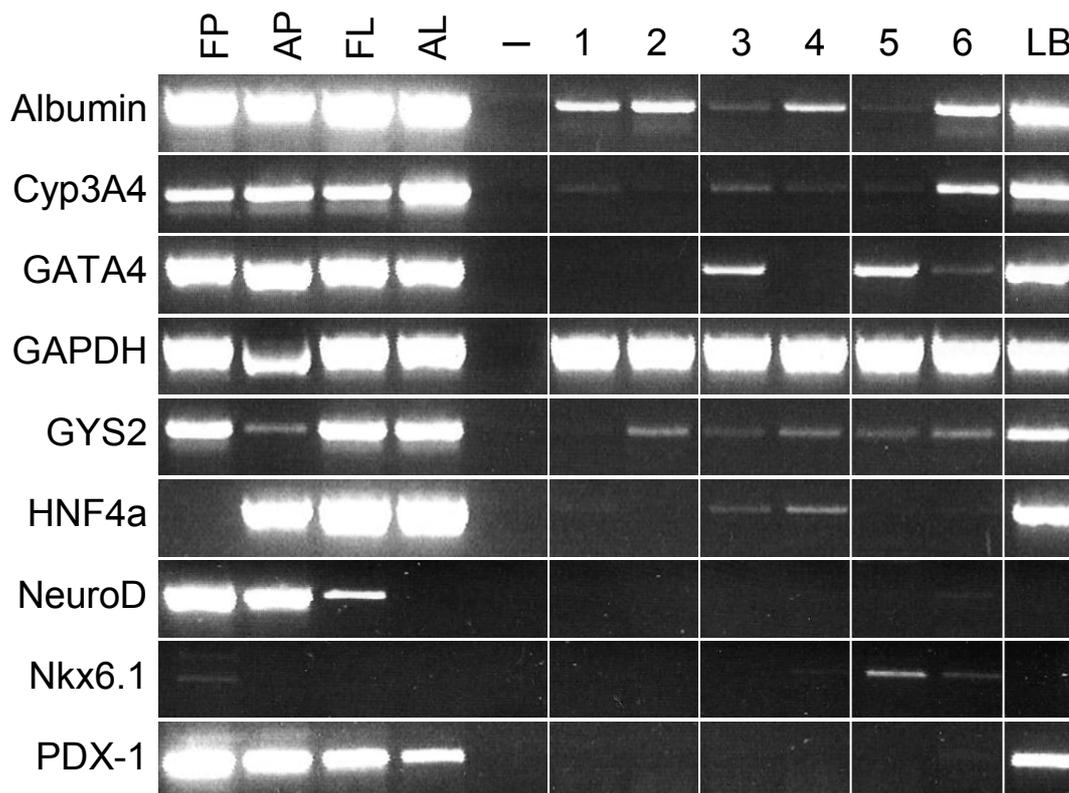


Abbildung 3.21: Lichtmikroskopische Aufnahme der USSC Cokultur mit humanem Lebergewebe nach 11 Tagen. **A** USSC alleine in DMEM + 10% FCS, **B** USSC alleine in HCM, **C** Transwell-Kultur mit DMEM + 10% FCS, **D** Transwell-Kultur mit HCM, **E** Cokultur mit konditioniertem DMEM + 10% FCS, **F** Cokultur mit konditioniertem HCM.



Nr.	Zelle	Medium	CoKultur	Dauer
1	SA5/03 P.8	DMEM+10%FCS	K	11Tage
2	SA5/03 P.8	HCM	K	11Tage
3	SA5/03 P.8	DMEM+10%FCS	TW / Leber	11Tage
4	SA5/03 P.8	HCM	TW / Leber	11Tage
5	SA5/03 P.8	DMEM+10%FCS	CM / 2Tage	11Tage
6	SA5/03 P.8	HCM	CM / 2Tage	11Tage

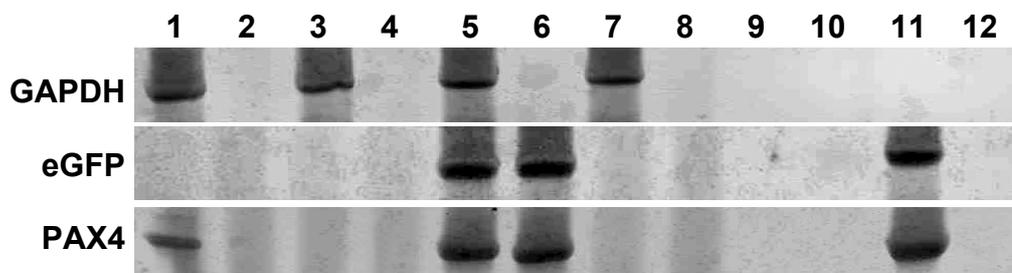
Abbildung 3.22: Agarose/EtBr. Transwell und konditioniertes Medium Cokultur mit humanem Lebergewebe. Die Expression von Albumin, Cyp3A4, GAT4, GYS2, HNF4a, ISL-1, NeuroD, Nkx6.1 und PDX-1 ist erhöht. Die Gene α -Feto, Cyp2B6, HNF1, HNF3b, Insulin, PAX4 konnten nicht nachgewiesen werden. FP=fötale Pankreas RNA, AP=Adulte Pankreas RNA, FL=fötale Leber RNA, AL=adulte Leber RNA, LB= RNA aus dem für die Transwell Ansätze benutzten Lebergewebe der Biopsie (13 Tage post-OP), -= kein Template.

Cyp3A4 war in allen Proben leicht exprimiert, jedoch verstärkt in HCM-CM zu finden. GYS2 fand sich in allen Ansätzen außer der DMEM + 10% FCS Kontrolle. HNF4a wurde in beiden Medien der TW Kultur gebildet, jedoch in keinem der anderen Ansätze. Bei NeuroD und PDX-1 war eine sehr schwache Bande im HCM-CM zu erkennen. Nkx6.1 war in der fötalen und adulten Pankreas-Kontrolle kaum exprimiert, dafür aber in beiden Medien des CM-Versuches. Insulin, NeuroD, Nkx6.1 und PAX4 sind pankreasspezifische Gene und wurden nicht in der PCR der Leberbiopsie gefunden. Alle anderen Gene wurden im Lebergewebe exprimiert.

3.2.2.3 Überexpression eines endodermalen Genes

Aus Arbeiten mit murinen embryonalen Stammzellen (Blyszczuk *et al.* 2003) ist bekannt, dass die Überexpression von PAX4 zu einer Differenzierung der Stammzellen in Richtung pankreatischer β -Zelle führt. Diese Technik wurde auch mittels Nukleofektion des *pcDNA3.1+hPAX4/IRES/eGFP* Plasmids für die USSC angewendet.

Durch diese Methode wurden jedoch nur sehr wenige stabil transfizierte Zellen (1 von 10^6 Zellen) generiert. Bis diese in genügend hoher Zellzahl für die Analyse vorlagen, hatten die USSC bereits eine sehr hohe Passagenzahl erreicht. Die Überexpression von PAX4 ergab mit dieser Methode keine Veränderung der Genexpression in endodermaler Richtung. PAX4 und eGFP konnten in den transfizierten Zellen jedoch nachgewiesen werden (Abb.3.23).



Nr.	RNA	Transfizierte DNA	Reaktion
1	FP/AL	-	RT-PCR
2	FP/AL	-	PCR
3	SA4/48 P.4	-	RT-PCR
4	SA4/48 P.4	-	PCR
5	SA4/48 P.4	Plasmid PAX4	RT-PCR
6	SA4/48 P.4	Plasmid PAX4	PCR
7	SA4/48 P.4	Plasmid Amaxa	RT-PCR
8	SA4/48 P.4	Plasmid Amaxa	PCR
9	-	-	RT-PCR
10	-	-	PCR
11	-	Plasmid PAX4	PCR
12	-	Plasmid Amaxa	PCR

Abbildung 3.23: Testnukleofektion der USSC. FP/AL = Pool von fötaler Pankreas RNA und adulter Leber RNA. Plasmid PAX4= *pcDNA3.1+hPAX4/IRES/eGFP*, Plasmid Amaxa = im Kit enthaltenes Amaxa Testplasmid *pmaxGFP*. RNA Isolierung hier ohne DNase Verdau.

GAPDH wurde in der RNA des Leber- und Pankreas-Pools, wie auch in der USSC bei der RT-PCR Reaktion exprimiert. In der PCR alleine entstand keine Bande, da die GAPDH Primer nur an der RNA binden. In der Wasser- und Plasmid-Kontrolle

war das Housekeeping-Gen nicht enthalten. eGFP dagegen fand sich nur in den mit PAX4 transfizierten Zellen und auf der PAX4-Plasmid-Kontrolle. Auf dem Amaxa Testplasmid befindet sich ein modifiziertes GFP (pmaxGFP), welches von den eGFP-Primer nicht erkannt wurde. PAX4 befand sich wie eGFP in den transfizierten Zellen und auf dem Plasmid, in der fötalen Pankreas Kontrolle wurde die RNA ebenfalls exprimiert. PAX4 und eGFP Expression konnte zwar in den transfizierten Zellen mit und ohne DNase-Verdau nachgewiesen werden, dies führte jedoch ohne weitere Zusätze oder Faktoren zu keiner Differenzierung der USSC in endodermaler Richtung.

Diskussion



Im Laufe dieser Arbeit wurden insgesamt 94 USSC-Zelllinien aus 233 Nabelschnurblutpräparaten generiert und verschiedene Zelllinien mittels Durchflußzytometrie analysiert. Anschließend wurden insgesamt 19 Zelllinien der Passagen 3 bis 9 für Differenzierungsexperimente eingesetzt. Dabei kamen unterschiedliche Methoden zur endodermalen Differenzierung der USSC zum Einsatz. Es wurden breit gefächerte *in vitro* Ansätze analysiert, um die Auswirkung von Faktoren, Medien und Beschichtungen auf die Genexpression zu untersuchen. Zudem wurden Cokulturen der USSC mit verschiedenen Geweben ausgetestet und zwei *in vivo* Modelle eingesetzt.

4.1 Endodermale Differenzierung der USSC im *in vivo* Modell

Bei der endodermalen Differenzierung der USSC *in vivo* wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Zum einen das bereits zuvor etablierte präimmune *in utero* Schafmodell als Langzeit- und entwicklungsbiologisches System, zum anderen die uPA/Scid-Maus als Läsionsmodell. Es konnte jedoch nur im Schafmodell der Nachweis der USSC-Differenzierung erbracht werden.

In utero Schafmodell

Aus dem zuvor erfolgten Einsatz von USSC im Schafmodell (Kogler *et al.* 2004) war bekannt, dass USSC in der Lage sind sich in Herzzellen, hämatopoietische- und lymphoide Zellen, sowie Hepatozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren.

Bei dem erneuten Einsatz dieses Modells im Rahmen dieser Arbeit konnte 17 Monate nach der Transplantation im Serum der Schafe humanes Albumin nachgewiesen werden (vgl. Abb.3.4). Dies wies auf das Vorhandensein von humanen Leberzellen in den Schafen hin. Zu diesem Zeitpunkt sprach alles dafür, dass ebenso wie in dem vorherigen Versuch eine Differenzierung der USSC in Hepatozyten-ähnliche Zellen stattgefunden hatte. Die immunohistochemische Analyse der Organe erfolgte jedoch erst zehn Monate später. Hier konnten in keinem der vier analysierten Schafe humane Zellen nachgewiesen werden. Das Serum wurde nicht noch einmal auf Albumin untersucht, im Blut der Tiere wurden keine humanen hämatopoietischen Zellen gefunden.

Alle bisherigen Transplantationen von Stammzellen in diesem Tiermodell wurden zu früheren Zeitpunkten beendet. Die Differenzierung von MSC in Herzzellen (Airey *et al.* 2004) wurde zwei bis drei Monate nach Transplantation, noch vor der Geburt der Lämmer beendet. Die Differenzierung von HSC in Leberzellen (Almeida-Porada *et al.* 2004) wurde zum spätesten Zeitpunkt nach elf Monaten untersucht. Die Differenzierung von USSC in Herzzellen wurde nach acht Monaten, in hämatopoietische Zellen nach zwölf Monaten und in Leberzellen nach 14 Monaten analysiert (Kogler *et al.* 2004).

Damit stellte die Untersuchung des Serums nach 17 Monaten den spätesten Nachweis von humanen Zellen in diesem System dar. 27 Monate nach der Transplantation konnten weder Zellen in der Leber, der Milz, den Nieren, dem Gehirn noch im Pankreas nachgewiesen werden.

Eine Einwanderung der Zellen in das Gehirn der Schafe war in diesem System jedoch eher unwahrscheinlich. Die das Gehirn fest umschließende Blut-Hirn-Schranke lässt normalerweise keine Zellen durch. Allerdings werden Neurone nur sehr selten neu aufgebaut, so dass sich dieses Gewebe gut für einen Langzeitnachweis von differenzierten Zellen eignet. Alle anderen untersuchten Organe haben einen höheren Zellumsatz, bei dem zwei Erneuerungs-Mechanismen zum Einsatz kommen: die Gewebe-Erneuerung durch Stammzellen und die Teilung der vorhandenen Zellen durch Mitose.

Die Erneuerung durch Stammzellen würde eine einfache Erklärung für das Verschwinden der humanen Zellen aus dem Schafgewebe liefern. Nachdem sich die USSC im Gewebe ausdifferenziert hatten, übten sie für eine gewisse Zeit ihre

Funktion aus und starben dann ab. Anschließend wurden sie durch neu entstandene Zellen aus den Stammzellen des Schafes abgelöst. Die humanen Zellen wären nach einer bestimmten Zeit vollkommen aus dem Schafgewebe eliminiert.

Die Möglichkeit, dass die USSC die Rolle einer Gewebestammzelle übernommen haben könnten ist in diesem Zusammenhang unwahrscheinlich, da die speziellen „Stammzellnischen“ bereits von den Schafzellen besetzt waren und die frei im Organismus vorliegenden USSC den entwicklungsbiologischen Prozessen des Schafes unterlagen.

Wie in der Einleitung bereits angesprochen, besitzt die Leber ein sehr hohes intrinsisches Regenerationspotential. Obwohl die ovale Zelle als Leberstammzelle anerkannt und charakterisiert ist, spielt sie im normalen Zellhaushalt des Organs eine eher untergeordnete Rolle. Die vorhandenen Hepatozyten sorgen, indem sie sich teilen, selber für den Zellersatz. Selbst eine chirurgische Entfernung von zwei Dritteln der Leber kann durch Zellersatz innerhalb weniger Wochen ausgeglichen werden. Die normale Zellerneuerungsrate in der Leber ist aber mit einem halben Jahr weitaus niedriger (Konrad Kunsch, Der Mensch in Zahlen, Spektrum Verlag).

Es stellt sich somit die Frage, warum die humanen Zellen in der Schafleber nicht mehr aufzufinden waren. Möglicherweise teilten sich die Leberzellen des Schafes schneller als die humanen Leberzellen im chimären Tier. Da nur abgestorbene Zellen durch Teilung ersetzt werden, wurden die humanen Leberzellen eventuell durch Schafzellen ersetzt. Möglicherweise war dies ein Selektionsvorteil für das Schaf, da die humanen Zellen menschliche Produkte synthetisieren. Obwohl Mensch und Schaf genetisch verwandt sind, konnten die humanen Zellen vielleicht nicht die gleiche Funktionalität erreichen wie die schafeigenen Zellen.

Alle Tiere haben sich jedoch über den gesamten Zeitraum normal entwickelt. Es gab weder einen Hinweis auf Bildung von Tumoren, noch auf andere Veränderungen in den analysierten Organen.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass aufgrund der Größe der Schaforgane nur jeweils ein kleines Gewebestück immunohistochemisch untersucht werden konnte. Es wäre möglich, dass die Bereiche in denen humane Zellen vorliegen, in den Schnitten nicht getroffen wurden. Ein größerer Bereich der Leber ließe sich im durchflußzytometrisch nach Vereinzelung der Leberzellen untersuchen. Letztlich

kann aber nur ein Monitoring über einen engeren Zeitrahmen Aufschluss über den Verbleib der USSC geben.

uPA/Scid Maus Modell

Eine Transplantation von humanen Hepatozyten in das uPA/Scid Maus Modell führt zu einer Behebung des letalen Leberdefektes durch die Neubesiedlung der Mausleber mit humanen Leberzellen (Meuleman *et al.* 2005). Setzt man jedoch noch nicht ausgereifte, fötale Hepatoblasten in das System ein, so können die Mäuse nicht gerettet werden.

Auch die Transplantation von USSC in diesem Modell führte zu keiner Regeneration der Mausleber. Möglicherweise wurden die USSC vom kranken Lebergewebe nicht angezogen. Die erfolgreiche Transplantation von Zellen in einen anderen Organismus ist immer davon abhängig, dass der Empfänger eine geeignete Nische für die Einwanderung und die Expansion der transplantierten Zellen bietet. Aus Arbeiten mit HSC ist bekannt, dass Stammzellen vom läsioniertem Gewebe durch bestimmten Faktoren wie SDF-1, HGF und LIF angelockt werden (Kucia *et al.* 2005). Diese Faktoren werden von USSC in erhöhtem Maße bereits selber produziert (Kogler *et al.* 2005), die jeweiligen Rezeptoren (z.B. CXCR4) für diese Faktoren sind in den USSC jedoch kaum aktiv. Damit konnten die USSC den Defekt möglicherweise nicht erkennen und wanderten dementsprechend auch nicht in das läsionierte Gewebe ein.

Durch die vermehrte Ausschüttung dieser anlockenden Faktoren könnten die USSC aber einen positiven Effekt auf die Mobilisierung der mauseigenen Stammzellen gehabt haben. Allerdings hatten in diesem Tiermodell alle Mauszellen, inklusive den Mausstammzellen den gleichen Gendefekt. Durch Differenzierung der Stammzellen in Hepatozyten, wurden bei Aktivierung des Albumin-Promotors auch neu entstandene Leberzellen der Maus durch eine toxische uPA-Akkumulation abgetötet.

Dieses Modell war für die endodermale Differenzierung der USSC offensichtlich nicht geeignet. Vermutlich wurden die USSC letztlich durch die Lungenkapillaren aus dem Blutkreislauf gefiltert. Dieses Phänomen tritt auch bei intravenöser Injektion von MSC in Mäusen auf (Barbash *et al.* 2003; Bentzon *et al.* 2005). Man führt dies auf die relative Größe der Zellen, sowie dem hohen Anteil an exprimierten Adhäsionsmolekülen zurück.

Möglicherweise ist ein Großtiermodell wie das Schaf-Modell für die Differenzierung der USSC generell besser geeignet als das Maus-Modell. Die Maus entwickelt sich in nur drei Wochen zum lebensfähigen Organismus, während das Schaf mit fünf Monaten weitaus näher am menschlichen Zeitablauf der Entwicklung liegt.

Die humanen Zellen unterliegen bei der Entwicklung somit einem ganz anderen Zeitfenster und entwickeln sich für das Maus-Modell möglicherweise viel zu langsam, auch wenn der generelle Ablauf der Endodermentwicklung im Säugetier konserviert ist.

4.2 Endodermale Genexpression

Die Embryonalentwicklung von Leber und Pankreas aus dem frühen Endoderm läuft nach einem streng geregelten Muster ab. Es wird nur dann die richtige Zelle generiert, wenn der „Entwicklungsfahrplan“ genau eingehalten wurde. Entscheidend dabei sind die richtigen Faktoren, die entsprechende Konzentration und Kombination und der richtige Zeitablauf. Durch die Position einer Zelle im Gewebeverband wird bestimmt, welchen Faktorenkombinationen sie ausgesetzt ist. Somit entwickelt sich aus Zellen gleichen Ursprungs, durch verschiedene Faktorgradienten, eine große Anzahl von spezialisierten Zellen. Diese unterliegen wiederum einer diffizilen Regulation durch Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Gene. Am Ende entscheidet der richtige Cocktail ob aus einer primitiven Endodermzelle eine Hepatozytenzelle oder eine β -Zelle entsteht.

Die Nachahmung der endodermalen Entwicklungsprozesse *in vitro* wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe verschiedener Faktorkombinationen, Medien und Beschichtungen untersucht. Dabei ergaben sich für unterschiedliche Zusammenstellungen der Differenzierungsmedien verschiedene Expressionsmuster der untersuchten Gene. Manche Gene wiesen dabei auf bestimmte Gewebe oder auf ein bestimmtes Entwicklungsstadium hin.

In Tabelle 4.1 ist dargestellt, in welchen Geweben die untersuchten Gene exprimiert wurden. In den meisten Fällen ist die Genexpression nicht auf ein Organ beschränkt, sondern wird auf niedrigerem Level auch in anderen Geweben gefunden. Dabei ist zu beachten, dass die Transkription der Gene nicht zwingend zum Aufbau des jeweiligen Proteins führt. Einige der Gene sind für Leber oder Pankreas spezifisch,

während andere in beiden Geweben oder sogar in vielen Geweben exprimiert werden.

Tabelle 4.1 Expression der untersuchten Gene in unterschiedlichen Geweben.

Untersuchte Gene inklusive Unigene Gruppen Nummer*																
	a-Feto Hs.518808	Albumin Hs.418167	Cyp2B6 Hs.558317	Cyp3A4 Hs.567234	GATA4 Hs.243987	GAPDH Hs.544577	Gys2 Hs.82614	HNF1 Hs.567251	HNF3b Hs.155651	HNF4a Hs.116462	Insulin Hs.89832	ISL-1 Hs.505	NeuroD Hs.72981	Nkx6.1 Hs.546270	PAX4 Hs.129706	PDX-1 Hs.32938
Gewebe	Anzahl der Transkripte im Gewebe pro Million nach "UniGene's EST ProfileViewer"															
Blase	0	0	0	0	0	2945	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Blut	0	0	0	0	0	3635	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0
Knochen	0	0	0	0	0	2096	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Knochenmark	0	0	0	0	0	894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gehirn	8	29	2	4	8	3383	0	4	0	0	0	0	20	0	0	0
Gebärmutterhals	0	0	0	0	0	7397	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dickdarm	5	10	0	0	5	3042	0	21	54	136	0	10	0	0	0	0
Auge	0	22	0	5	16	3882	0	28	5	0	0	84	209	0	0	0
Herz	441	932	0	0	65	2225	0	0	0	0	114	0	0	0	0	0
Niere	48	836	6	27	0	3082	13	27	13	110	0	0	0	0	0	0
Kehlkopf	0	0	0	0	0	5217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leber	808	49452	237	801	66	2961	207	14	14	155	0	0	0	0	0	0
Lunge	36	244	23	3	13	4561	0	3	110	0	3	13	3	0	0	0
Lymphknoten	0	7	0	0	0	4571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brustdrüse	0	55	13	0	0	3420	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
Muskel	9	977	0	9	9	3650	0	0	0	0	0	19	125	0	0	0
Eierstock	0	0	0	10	131	7117	0	0	0	10	10	0	0	30	0	0
Pankreas	0	44	0	0	68	2436	0	0	34	0	16609	49	191	34	0	103
peripheres Nervensystem	0	0	0	0	0	8502	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0
Plazenta	69	61	0	0	16	2889	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0
Prostata	0	0	0	0	0	2673	0	7	0	0	7	14	0	0	0	0
Haut	0	0	0	0	5	9226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dünndarm	0	0	0	212	0	5448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Weichteile	0	0	0	0	0	1466	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Milz	1263	21276	0	0	0	758	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Magen	0	8	0	0	53	3116	0	8	8	26	0	8	0	0	0	0
Zunge	0	0	0	0	0	1237	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hoden	0	21	0	0	100	1439	0	14	0	0	0	42	0	0	0	0
Thymus	142	142	0	0	142	568	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gebärmutter	5	15	0	0	0	3725	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0
Gefäße	37	0	0	0	0	1155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Embryo	663	4498	0	11	47	1274	26	8	19	19	22	13	17	0	0	0
Adult	42	3637	19	96	11	2108	22	1	3	30	117	9	27	0	0	0

*Die Daten wurden der NCBI Unigene Gendatenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene> entnommen.

α-Fetoprotein wird hauptsächlich im embryonalen Gewebe gefunden, aber auch in der adulten Leber exprimiert. Albumin findet sich dagegen in der adulten Leber, wird aber auch von anderen Geweben exprimiert. Die Hepatozyten sind im Organismus die einzigen Zellen, die das Protein Albumin produzieren. Im Rückschluss bedeutet

dies jedoch nicht, dass eine im Labor generiert Zelle die Albumin produziert, auch eine Hepatozytenzelle ist.

Cyp2B6 und Cyp3A4 sind spezifisch für die adulte Leber, die Transkriptionsrate in anderen Geweben ist vergleichsweise niedrig. GATA4 kommt in Pankreas und Leber gleichhäufig vor, wird aber auch von anderen Geweben ähnlich oder sogar stärker exprimiert. Generell findet es sich aber eher im Embryo als im adulten Organismus und kann auf eine frühe Entwicklungsstufe hinweisen. GAPDH wird als Housekeeping-Gen in allen Zellen exprimiert und fungiert als Kontrolle. GYS2 ist dagegen im embryonalem Gewebe und der adulten Leber konserviert. HNF1 findet sich nicht im Pankreas aber in mehreren anderen Organen. HNF3b dagegen ist in verschiedenen endodermalen Geweben inklusive Leber und Pankreas zu finden. Beide Gene sind auch in der Embryonalentwicklung aktiv. Dies gilt auch für HNF4a, welches neben einigen andern endodermalen Organen in der adulten Leber, nicht aber im Pankreas exprimiert wird. Insulin wird von einigen Geweben exprimiert, aber nur die β -Zellen produzieren es auch. Es gilt für Insulin ähnlich wie bei Albumin, das die einzigen Zellen die das Hormon Insulin produzieren, die β -Zellen sind. Eine Insulin-produzierende Zelle, muss aber nicht zwingend eine β -Zelle sein.

ISL-1 und Nkx6.1 werden von verschiedenen Geweben exprimiert, sie finden sich beide im Pankreas, jedoch nicht in der Leber. PDX-1 ist dagegen nur auf das Pankreasgewebe beschränkt. Zu PAX4 gibt es keine Angaben.

Die in dieser Arbeit etablierten Primer wiesen auf ein ähnliches Expressionsmuster in fötalem und adultem Pankreas- und Lebergewebe hin (vgl. Abb.3.8). Abweichend zeigte sich, dass Albumin, Cyp3A4 und HNF4a in allen vier Geweben ähnlich stark exprimiert wurden und nicht auf das Lebergewebe beschränkt waren. Dies ist möglicherweise auf die Qualität des zur Isolierung verwendeten Gewebes zurückzuführen, da die Primer so spezifisch wie möglich angelegt wurden (vgl. Abschnitt 2.3 Nachweis der Genexpression). Das in Tabelle 4.1 nicht näher erläuterte PAX4, wurde in der RT-PCR nur im fötalen Pankreas exprimiert.

Im Folgenden gilt somit, dass Albumin, Cyp3A4, GATA4, HNF1, HNF3b, HNF4a und ISL-1 aufgrund der RT-PCR Kontrollen als allgemeine endodermale Marker anzusehen sind, α -Fetoprotein und GYS2 als Marker für Leber und fötales Gewebe, Cyp2B6 als Lebermarker und Insulin, NeuroD, Nkx6.1, PAX4 und PDX-1 als Pankreasmarker.

4.3 Endodermale Differenzierung der USSC durch Faktoren

Bei der Differenzierung der USSC durch Faktoren konnte beobachtet werden, dass eine hohe Proliferationsrate und eine hohe Konfluenz der Zellen sich negativ auf die endodermale Differenzierung auswirkt. Wenn Zellen proliferieren, differenzieren sie nicht und umgekehrt. Große Versuchsansätze mit vielen Zellen zur RNA-Gewinnung erhöhten die Spezifität der RT-PCR Reaktion. Manche Faktorkombinationen führten dabei zu starken Veränderungen der Zellmorphologie, welche sich jedoch nicht in einer Veränderung der Genexpression widerspiegelten. Andere Zellen die morphologisch kaum an endodermale Zellen erinnerten, exprimierten wiederum endodermale Gene.

Viele der in Appendix A angegebenen Faktorkombinationen führten zu einer nur leichten oder unspezifischen Veränderung der Genexpression. Einige Protokolle, die für ES-Zellen etabliert wurden, führten zu keiner Differenzierung der USSC in endodermale Richtung (Schuldiner *et al.* 2000; Lumelsky *et al.* 2001). Protokolle für adulte Stammzellen ließen sich erfolgreicher auf die Differenzierung der USSC übertragen.

In den meisten Fällen wurde zum Nachweis das PAGE/Silber-Gelsystem gewählt, da hier sehr geringe Expressionen sichtbar gemacht werden konnten. Allerdings konnten größere Unterschiede in der Höhe der Genexpression nicht ohne weiteres abgeschätzt werden, da das Gel schnell überladen war. Zudem hatte diese Methode den Nachteil des hohen Zeitaufwandes und des geringen Probendurchsatzes. Daher wurde für die erfolgsversprechenden Ansätze später das Agarose/EtBr System verwendet.

Einige Differenzierungsprotokolle führten zur spezifischen Erhöhung der Expression der untersuchten endodermalen Gene: Bei Behandlung der Kulturen mit Retinolsäure (RA) erhöhte sich die Expression von Albumin und HNF4a, welche in diesem Fall allgemeine endodermale Marker darstellten (vgl. Abb.3.13). Der Differenzierungsgrad schien hier gering zu sein, da nur wenige Gene nachgewiesen werden konnten. Retinolsäure leitete eine ungerichtete Differenzierung der Zellen und Apoptose ein. Der Zusatz von weiteren Wachstumsfaktoren würde vermutlich eine weiterführende Differenzierung in endodermaler Richtung ermöglichen. Eine Verlängerung der Versuchsdauer durch eine niedrigere RA Konzentration wäre ebenfalls erstrebenswert.

Auch bei embryonalen Stammzellen konnte durch den Einsatz von Retinolsäure keine vollständige endodermale Differenzierung erreicht werden. Hier wurde zwar der frühe Pankreas-Marker PDX-1 und einige HNF Gene exprimiert, jedoch führte dies nicht zur funktionellen Insulin-Sekretion der ES-Zellen (Micallef *et al.* 2005).

Der Einsatz einer Matrigel-Matrix ergab in einigen Experimenten eine Erhöhung der Expression von verschiedenen Genen. Bei der stärksten Veränderung waren Albumin, Cyp2B6, Cyp3A4, Gys2 und ISL-1 (vgl. Abb.3.9) exprimiert. Diese Gene wiesen auf keine klare Gewebezugehörigkeit hin. Hier waren allgemeine endodermale Gene, wie auch spezifische Leber- und Pankreasgene aktiviert.

Matrigel wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Tumor gewonnen und wird als Beschichtung oder 3D-Gelmatrix zur Initiierung der Differenzierung eingesetzt. Es enthält verschiedene Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix in veränderlichen Anteilen. Die Produktbroschüre gibt die in Tabelle 4.2 zusammengefassten Werte an:

Tabelle 4.2: Zusammensetzung von Matrigel.

Wachstumsfaktoren		
EGF	epidermal growth factor	0,5-1,3 ng/ml
bFGF	basic fibroblastic growth factor	<0,1-0,2 pg/ml
NGF	nerve growth factor	<0,2 ng/ml
PDGF	platelet derived growth factor	5-48 pg/ml
IGF-1	insulin-like growth factor-1	11-24 ng/ml
TGF- β	transforming growth factor beta	1,7-4,7ng/ml
Extrazelluläre Matrix-Faktoren		
Laminin	Membran Komponente	56%
Collagen IV	Membran Komponente	31%
Entactin	Membran Komponente	8%

Da es sich bei Matrigel um eine veränderliche organische Substanz handelt, können Differenzierungsexperimente stark variieren. Schwankungen der Wachstumsfaktorkonzentrationen können zu nicht-reproduzierbaren Ergebnissen führen. In diesem Zusammenhang lässt sich die Änderung der Genexpression durch Matrigel in USSC nicht mit der Matrigel-Differenzierung von humanen MAPC vergleichen (Schwartz *et al.* 2002). In der Arbeit von Schwartz wurden in der RT-PCR Albumin, Cytokeratin 18 und HNF3 β nachgewiesen. Bei der Immunohistochemie der Zellen waren zu verschiedenen Zeitpunkten zusätzlich GATA4, HNF1a und α -Feto exprimiert.

Die Kombination der Wachstumsfaktoren OSM und HGF im Differenzierungsmedium IMDM mit 10% FCS, ITS und Dexamethason ergab das interessanteste Expressionsmuster (vgl. Abb.3.12). Im Differenzierungsmedium alleine wurde nur eine leichte Expression von Albumin und HNF4a beobachtet. Mit Zugabe von HGF war neben Albumin auch GATA4, GYS2 und ILS-1 erhöht. Die Expression dieser Gene verstärkte sich durch die Zugabe von OSM noch weiter. Die exprimierten Gene wiesen hier wieder auf eine generelle endodermale Differenzierung der Zellen mit einer Kombination von Pankreas- und Lebergenen hin.

Die Zellen mit einer Expression des leberspezifischen GYS2 Gens, welches für das Enzym Glykogen-Synthase der Leber kodiert, wurden zusätzlich PAS gefärbt. Mit Hilfe der PAS-Färbung wurden keine undifferenzierten Zellen angefärbt, jedoch konnte in den differenzierten Zellen Glykogen nachgewiesen werden. Damit wurde eine leberspezifische Funktionalität der Zellen gezeigt. Auch morphologisch veränderten sich die Zellen mit Zugabe der Wachstumsfaktoren deutlich.

Anhand von mesenchymalen Stammzellen konnten ähnliche Differenzierungen gezeigt werden, allerdings wurde in dem Fall ein ungeeignetes Nachweissystem mit unspezifischen Primern eingesetzt (Hong *et al.* 2005).

Zusammengefasst führten verschiedene Kombinationen zu einer intermediären Zelle mit Expression von generellen endodermalen Markern bis hin zu spezifischen, nur in Pankreas oder Leber exprimierten Genen. Möglicherweise wurden in den Ansätzen die richtigen Faktoren, aber nicht die richtige Kombination oder das richtige Zeitintervall getroffen um den korrekten Ablaufplan der Entwicklung zu imitieren. Es entstand ein "endodermaler Progenitor", der Eigenschaften von beiden Organen besaß und aus dem sich vermutlich der eine oder der andere Gewebetyp entwickeln kann. Eventuell liegt während der Embryonalentwicklung sogar eine endodermale Zelle mit ähnlichen Eigenschaften vor, die sich später über bestimmte Zwischenstufen in eine Pankreas- oder Leberzelle umwandelt.

Im Vergleich mit den *in vitro* Arbeiten der embryonalen Stammzellen sind die USSC mit der Faktor-Induktion ähnlich weit differenzierbar. Auch in den ESC-Protokollen konnte z.B. durch Retinolsäure nur eine Initiierung der Differenzierung erreicht werden, aber keine Ausreifung der generierten Progenitoren zu funktionellen Zellen. In diesen Versuchen wurden Gene wie PDX-1 und HNF aktiviert; jedoch ist zu beachten dass sich parallel zu den endodermalen Zellen auch Zellen anderer

Gewebetypen entwickelten. Beispielsweise konnte beobachtet werden, dass sich PDX-1 positive Zellen in der Nähe von Herzmesoderm-Zellen entwickelten, analog zur Embryonalentwicklung des Endoderms (Micallef *et al.* 2005). Eine solche unterstützende Umgebung ist bei den USSC nicht gegeben, könnte die Differenzierung aber auch hier positiv beeinflussen.

4.4 Endodermale Differenzierung der USSC durch Cokulturen

Die genaue Nachstellung der Embryonalentwicklung ist auf artifiziellem Wege schwierig. Obwohl man bereits sehr viel über die entwicklungsbiologischen Vorgänge und die verschiedenen Genregulationswege weiß, sind noch lange nicht alle Faktoren und Abläufe bekannt.

Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuchsansatz das Modell der Cokultur ausgetestet: Statt alle Faktoren synthetisch von Außen zuzuführen, wurden Zellen endodermalen Ursprungs zusammen mit USSC kokultiviert. Die endodermalen Zellen stellten in diesem System damit die natürlichen Wachstumsfaktoren und die extrazellulären Matrix Komponenten bereit. Die Cokulturen wurden entweder über ein Transwell-System durchgeführt, bei dem nur ein Faktorenaustausch über eine Membran stattfinden konnten oder über die direkte Cokultur, mit Zell/Zell-Kontakt. Als endodermale Zellen für die Cokultur wurden primäre Ratten-Hepatozyten, verschiedene Schafgewebe und humanes Lebergewebe eingesetzt.

Des Weiteren wurde Medium mit Schafgewebe konditioniert und für die Differenzierung der USSC eingesetzt.

Bei der direkten Cokultur der USSC mit Ratten-Hepatozyten waren Albumin, Cyp3A4 und GATA4 leicht erhöht. Speziell in der Cokultur in HCM Medium war die Albumin Expression von Woche eins bis sechs mit und ohne Hepatozyten-Zellen am stärksten erhöht. In diesem Medium waren unter anderem Insulin, Transferrin und der Wachstumsfaktor EGF enthalten. Insulin und Transferrin kamen als Faktorkombination im ITS-Mix in dem Differenzierungsansatz mit HGF und OSM vor (siehe oben) und schienen einen positiven Effekt auf die Zelldifferenzierung zu haben. EGF war dagegen in der Matrigel-Matrix enthalten, welche die Differenzierung ebenfalls förderte. Die Cokultur mit den endodermalen Zellen verstärkte den Effekt des HCM-Mediums zusätzlich. Durch den Zell/Zell-Kontakt wurde der direkte Austausch von Faktoren und die Kommunikation über die Oberflächenmoleküle der Zellen

ermöglicht. Diese wichtigen Wechselwirkungen der Zellen untereinander hatten offensichtlich einen positiven Effekt auf die Differenzierung der USSC.

Generell ist der Austausch über den direkten Zellkontakt für viele verschiedene Zellen wichtig und ist auch für die Ausbildung der Stammzellnischen im Gewebe von großer Bedeutung.

Ein Nachteil des verwendeten Cokultur-Systems, ist das die von den Ratten-Zellen sezernierten Faktoren von den humanen Rezeptoren erkannt werden müssen. Während das HGF der Ratten zum Beispiel mit ca. 98% sehr homolog zu humanen HGF ist, gibt es beim Faktor EGF nur eine 67%ige Ähnlichkeit der Proteinsequenzen. Möglicherweise könnten also nur einige der von den Rattenzellen ausgeschütteten Faktoren mit den USSC-Rezeptoren wechselwirken.

Durch Einsatz eines Läsionsmodells mit Stauroporin sollte ausgetestet werden, ob sich die Faktoren-Ausschüttung der Hepatozyten ins Medium verändert. Ähnlich wie bei der normalen Leber-Regeneration sollten die absterbenden Leberzellen andere in der Umgebung befindlichen Zellen, zur Generierung von neuen Hepatozyten anregen. In diesem Modell fand allerdings keine Differenzierung in endodermaler Richtung statt, die von den Hepatozyten ausgeschütteten Faktoren veränderten die USSC morphologisch in neuronaler Richtung. Die Ähnlichkeiten der endodermalen und neuronalen Entwicklung wurde bereits zuvor postuliert. Aufgrund des Markers Nestin, den einige Zellen des Pankreas exprimieren, wurde angenommen, dass es sich hier möglicherweise um neuronale und nicht endodermale Zellen handeln könnte. Auch sind die Gene *Nkx6.1* und *NeuroD* in neuronalen Zellen aktiv. Allerdings fanden sich solche Rückschlüsse eher im Zusammenhang mit der Differenzierung in Insulin-sekretierende Zellen (Edlund 2002).

Die Differenzierung der USSC in Albumin-produzierende Zellen, war bereits aus dem *in utero* Schafmodell bekannt. In diesem Falle schien es keine Probleme mit der xenogenen Faktor-Erkennung zu geben. Offensichtlich fand hier eine Wechselwirkung der Schafmoleküle mit den USSC-Rezeptoren statt, die eine Differenzierung auslösten. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Ansatz die Cokultur mit Schafgewebe durchgeführt. Durch die mechanische Beschädigung des tierischen Gewebes lag zusätzlich ein Schädigungsmodell vor, bei dem besonders viele Faktoren sezerniert wurden.

Durch die Cokultur kam es zu starken morphologischen Veränderungen der Zellen mit granulären Strukturen, was auf die Ausbildung einer Drüsenzelle hindeutete. Diese Veränderungen wurden bereits nach wenigen Tagen deutlich und wiesen auf eine schnelle Differenzierung der USSC in diesem System hin. Jedoch schüttete das Schafgewebe nicht nur Wachstumsfaktoren in das umgebende Medium aus. Es sezernierte auch die von Leber und Pankreas gebildeten Verdauungsenzyme, welche in zu hoher Konzentration für die USSC und die Gewebezellen schädlich waren.

Aufgrund der schnellen morphologischen Veränderungen der Zellen wurden diese nach nur acht Tagen in der RT-PCR analysiert. Aufgrund der kurzen Zeitspanne konnte jedoch nur eine leichte Erhöhung der Expression von Albumin und Cyp3A4 durch die Cokultur mit Schafgewebe beobachtet werden. In der Cokultur mit Pankreasgewebe des Schafes wurde zudem eine Expression von α -Fetoprotein erreicht. Dies ist ein sehr frühes Gen, welches man in den anderen Differenzierungen ebenfalls erwartet hätte. Allerdings ist bekannt, dass α -Fetoprotein nur für kurze Zeit exprimiert und dann wieder herunterreguliert wird. Damit ist dieser Faktor nur in einem kurzen Zeitfenster detektierbar (Jang *et al.* 2004).

Dieser Versuch wurde nur als Transwell-Cokultur durchgeführt. Möglicherweise könnte das Gewebe durch Vereinzeln der Zellen auch als direkte Cokultur mit Zell/Zell-Kontakt durchgeführt werden, was die Differenzierung zusätzlich verstärken könnte.

Mit Schafgewebe konditioniertes Medium mit und ohne Zusatz von Retinolsäure, bewirkte keine Differenzierung der USSC in endodermaler Richtung. Im Ansatz ohne Retinolsäure trat wieder eine neuronale Morphologie der Zellen auf. Da das konditionierte Medium zwischenzeitlich kryokonserviert wurde ist zu vermuten, dass ein Teil der Faktoren durch das Einfrieren zerstört wurde.

Eine 100%ige Übereinstimmung der Faktoren konnte durch den Einsatz von humanem Gewebe erreicht werden. In diesem Fall muss jedoch eine strikte Zelltrennung zwischen den humanen USSC und den humanen Hepatozyten gewährleistet sein, um keinen falschen Nachweis in der RT-PCR zu erhalten. Die Zellen wurden dazu in der TW-Cokultur über eine Membran getrennt. Parallel wurde auch hier konditioniertes Medium eingesetzt.

In diesem Versuch war auffällig, dass in der RT-PCR bereits in den Kontrollen eine starke Albumin Expression zu beobachten war. Bei den Kontroll-Zellen in HCM-Medium ohne Cokultur war zudem auch GYS2 positiv. Hier reichte bereits das HCM-Medium aus, um eine Differenzierung einzuleiten. Die Albumin- und eine leichte Cyp3A4-Expression in DMEM-Medium lässt sich nur über eine spontane Differenzierung der Zellen erklären. Möglicherweise waren die Zellen im Vorhinein zu spät passagiert worden und begannen sich dann aufgrund des Platzmangels zu differenzieren. Normalerweise kommt es in einem solchen Fall jedoch eher zur Differenzierung der Zellen in Knochenodule.

In einigen Fällen konnte allerdings beobachtet werden, dass undifferenzierte Zellen eine leichte Albumin-Expression aufwiesen. Dies konnte durch die Array-Analyse jedoch nicht bestätigt werden. Alle vier untersuchten Gen-Abschnitte für Albumin waren bei der analysierten USSC-Zelllinie negativ. Im Gegensatz dazu zeigten die Arrays aber eine erhöhte Expression von α -Fetoprotein in den USSC an, welche in der RT-PCR der undifferenzierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Möglicherweise ist diese basale α -Feto-Expression zu niedrig, um sie in der RT-PCR zu detektieren. In der Kultur könnten jedoch einige wenige Moleküle dieses Proteins als trigger für die endodermale Differenzierung genügen. Vielleicht wurde α -Fetoprotein aus diesem Grund in kaum einem der Experimente gefunden, da es bereits in minimaler - aber möglicherweise ausreichender Konzentration von den USSC produziert wird.

Letztlich wurde aber auf dem Array nur eine USSC-Zelllinie untersucht, die sich in ihrem Expressionsprofil von anderen Zelllinien unterscheiden könnte. Minimale Veränderungen der Zellkulturbedingungen, z.B. durch Einsatz einer neuen FCS-Charge oder die Konfluenz der Zellen vor dem Passagieren können ein anderes Expressionsmuster hervorrufen.

Die Transwell-Cokultur von USSC mit humanem Lebergewebe, zeigte neben der Expression der Kontrollzellen noch weitere interessante Muster der Genexpression: In der TW-Cokultur in DMEM-Medium waren Albumin, Cyp3A4, GYS2, GATA4 und HNF4a erhöht. GATA4 war am stärksten exprimiert. Bei der TW-Cokultur mit HCM waren bis auf GATA4 die gleichen Gene erhöht. Hier war Albumin am stärksten vertreten. Da HCM einen offensichtlichen Effekt auf die Differenzierung hatte, wäre es möglich, dass die GATA4 Expression einen frühen Zeitpunkt der Differenzierung

kennzeichnet und es zur Erhöhung der Albumin-Expression oder weiterer Faktoren beiträgt. Danach wurde die GATA4 Expression möglicherweise wieder inaktiviert.

In den Ansätzen mit konditioniertem Medium konnte ein ähnliches Muster beobachtet werden. Auch hier war in DMEM-Medium GATA4 am stärksten exprimiert, während es in HCM nicht auftrat. Dagegen war im HCM-Medium Albumin wieder stärker exprimiert als in CM-DMEM. Zusätzlich war bei dem CM-Versuch in DMEM eine Expression von Nkx6.1 zu beobachten. Im CM-HCM Ansatz war zudem noch eine schwache Bande bei NeuroD und PDX-1 zu erkennen. Auch war Cyp3A4 in diesem Ansatz viel stärker exprimiert als unter den anderen Bedingungen. Offensichtlich sind in den ersten zwei Tagen von dem Lebergewebe andere Faktoren in die konditionierten Medien ausgeschüttet worden. Während bei der Transwell-Cokultur nur endodermale- und leberspezifische Faktoren aktiviert sind, kam es bei Kultur der USSC im CM zur Expression von pankreasspezifischen Genen. Dies zeigte deutlich, dass die Leber Faktoren ausschüttete, die das Gewebe auch in Richtung Pankreas differenzieren konnten. Diese Faktoren wurden aber offensichtlich nur für kurze Zeit sezerniert. Nach zwei Tagen änderte sich die Zusammensetzung und andere Gene wurden in den USSC aktiviert. Auffällig war auch, dass in den CM-Kulturen HNF4a im Gegensatz zu den TW-Kulturen exprimiert war.

Die Zellen des Lebergewebes waren nach ca. zwei Wochen noch vital und es konnte RNA aus ihnen gewonnen werden. Aus der Cokultur mit Ratten-Hepatozyten war bekannt, dass trotz der Trennung über die 1µm-Poren-Membran ein Transfer von RNA stattfinden kann. Durch das Absterben von Zellen im oberen Kompartiment wurde der Zellinhalt in das Medium abgegeben und die unteren Zellen konnten diese Zell-Komponenten aufnehmen. RNA wird jedoch meistens schnell abgebaut, so dass vermutlich nur geringe Mengen der Leber-RNA mit aufgereinigt wurden. Zudem war die Expression von CM- und TW-Kulturen ähnlich. Teilweise waren sogar Gene exprimiert, die im Lebergewebe gar nicht aktiv sind. Damit kann wohl von einer eher niedrigen RNA-Verunreinigung durch die Hepatozyten ausgegangen werden. Dies wurde auch in anderen Arbeiten bestätigt (Jang *et al.* 2004).

Durch die Cokultur mit verschiedenen Zellen endodermalen Ursprungs, konnte ein ähnlicher Differenzierungsgrad wie bei der faktorinduzierten Differenzierung erreicht werden. Zusätzlich traten durch die Cokultur mit Gewebe des Schafpankreas α -Fetoprotein auf und durch die Cokultur mit humanem Lebergewebe Nkx6.1, NeuroD

und PDX-1. Allerdings war bei letzteren Cokulturen auch GYS2 als Leberspezifisches Gen aktiv, so dass man hier ebenfalls von der Entwicklung eines endodermalen Progenitors sprechen muss. Es lag weder eine ausgereifte Leber- noch eine Pankreaszelle vor. Generell scheint es sehr schwierig zu sein, die Faktoren so zu begrenzen, dass nur Pankreas- oder nur Leberzellen entstehen. Selbst das eingesetzte humane Lebergewebe konnte die Differenzierung in Richtung Pankreas induzieren.

Die USSC waren somit in der Lage sich auch *in vitro* in Hepatozyten-ähnliche Zellen, wie sie auch aus dem Schafmodell bekannt sind, zu differenzieren. Zusätzlich exprimierten die USSC Gene vom Pankreasgewebe.

Niemals wurde die Expression von HNF1 und HNF3b (welche allgemeine endodermale Gene sind) gefunden. Die initiale Faktorkaskade war offensichtlich nicht ausreichend, um auch diese frühen Gene zu aktivieren. Möglicherweise fehlten hier die frühen Signale aus dem Herzmesoderm (Micallef *et al.* 2005). Auch Insulin und PAX4, welche beide spezifische Marker für Insulin-produzierende β -Zellen des Pankreas sind, konnten durch die verschiedenen Differenzierungsansätze nicht nachgewiesen werden. Somit wurde bislang nur eine frühe Stufe der Endodermalentwicklung erreicht, ohne dass sich die Zellen im weiteren Verlauf vollständig ausdifferenzierten und die späten β -Zell Marker exprimierten. Alle anderen allgemeineren endodermalen und auch leberspezifische Gene konnten durch unterschiedliche Methoden exprimiert werden. Damit ist die USSC in der Lage sich *in vitro* in endodermaler Richtung zu differenzieren. Die genaue Komposition der Differenzierungsfaktoren war offensichtlich noch nicht richtig, da es zu keiner vollständigen Differenzierung der USSC in eine funktionelle Leberzelle oder Pankreaszelle kam. Die Auswahl der hier untersuchten Gene ist aber bei weitem zu gering, um eine vollständige Charakterisierung darzustellen. Dazu müssen zusätzliche funktionelle Assays oder geeignete Tiermodelle eingesetzt werden.

4.5 Endodermale Differenzierung der USSC durch Überexpression

Durch die Überexpression von PAX4 sollte eine Differenzierung der USSC in pankreatische β -Zellen erreicht werden. Aus Vorarbeiten mit embryonalen Stammzellen war bekannt, dass der Anteil an Insulin-sekretierenden ES-Zellen durch PAX4 erhöht werden kann (Blyszczuk *et al.* 2003).

Allerdings stellte sich die Nukleofektion zur Übertragung des PAX4-Plasmides als nicht geeignete Methode heraus. Es konnten nur sehr wenige transfizierte Zellen generiert werden, die für die weitere Differenzierung nicht ausreichten. Die PAX4-Überexpression schien bei den wenigen transfizierten Zellen keine Auswirkung auf die anderen endodermalen Gene zu haben. Allerdings könnte eine Kultivierung der PAX4-positiven Zellen mit weiteren Faktoren zu einer Veränderung in endodermaler Richtung führen. Dazu muss aber eine größere Anzahl von PAX4-positiven USSC generiert werden können. Aus anderen Arbeiten mit USSC ist bekannt, dass sich die Stammzellen mit einem Lentivirus zu einem hohen Grad infizieren lassen. Das Plasmid kann so in mehr Zellen eingebaut werden, allerdings muss das von Develogen hergestellte Konstrukt in einen lentiviralen Vektor umklontiert werden. PAX4 könnte über diese Methode in einem hohen Anteil von Zellen stabil in die Zellen transduziert werden. Nach einer Selektion der PAX4 positiven Zellen könnten dann Langzeitbeobachtungen oder weitere Differenzierungsexperimente durchgeführt werden.

Die PAX4 Überexpression reicht aber vermutlich nicht aus, um die USSC in β -Zellen umzuwandeln. Da ES-Zellen ein intrinsisches Differenzierungspotential besitzen, muss PAX4 diesen Prozess nur unterstützen, aber nicht neu initiieren. Die USSC benötigen möglicherweise eine Vordifferenzierung, bei der sich PAX4 dann an der Ausreifung beteiligt. Vermutlich würde die Überexpression eines früheren und allgemeineren endodermalen Genes mehr Erfolg versprechen. PDX-1 oder HNF3b wären geeignete Kandidaten wie kürzlich auch in MSC gezeigt werden konnte (Moriscot *et al.* 2005).

4.6 Transdifferenzierung, Heterogenität und Fusion

Einige Arbeitsgruppen zweifeln an der Fähigkeit von adulten Stammzellen sich zu transdifferenzieren und führen als Grund immer wieder die Zellfusion oder die Heterogenität der Zellpopulationen an. Dies ist auf einige Arbeiten zurückzuführen, bei denen es nicht zur Transdifferenzierung von Stammzellen, sondern zur Fusion mit anderen Zellen kam (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Vassilopoulos *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003).

Auch wird vorgeschlagen, dass es nur eine bestimmte pluripotente Stammzelle (PSC) im adulten Organismus gibt, die durch Zirkulation in verschiedenen Geweben vorliegen kann und zusammen mit anderen „Stammzellen“ isoliert wird (Kucia *et al.*

2005, Eckfeldt, 2005 #300). In diesem Fall sollen dann nicht die HSC, MSC oder sonstigen Stammzellen für die Transdifferenzierung verantwortlich sein, sondern die Population der PSC.

Auch wird postuliert, dass bei der Aufreinigung von Gewebestammzellen noch weitere Stammzellen anderen Ursprungs mit aufgereinigt werden (Eckfeldt *et al.* 2005). Zum Beispiel könnten bei Isolation von Progenitorzellen aus Pankreasgewebe, Stammzellen aus dem zirkulierenden Blut enthalten sein. Damit würden sich die endodermalen Zellen nicht in mesodermale Zellen transdifferenzieren, sondern mesodermale HSC aus dem peripheren Blut würden sich nur innerhalb ihres eigenen Keimblattes ausdifferenzieren.

Geschürt werden die Zweifel an der Stammzellplastizität zusätzlich durch falsche Veröffentlichungen, die auch die embryonalen Stammzellen betreffen. Ein Beispiel ist hier die bereits erwähnte Aufnahme von Proteinen aus dem Medium (Rajagopal *et al.* 2003; Hansson *et al.* 2004; Sipione *et al.* 2004). Andere Differenzierungsprotokolle wiederum konnten von verschiedenen Laboren nicht nachvollzogen werden und wurden ebenfalls angezweifelt.

Tatsächlich waren in den ersten Differenzierungsversuchen adulter Stammzellen einige methodische Fehler gemacht worden, die erst im Nachhinein entdeckt wurden. Heutige moderne Verfahren, wie das Cre-Lox System (Janus *et al.* 2003) oder single-cell PCR (Kogler *et al.* 2004) zeigen jedoch, dass die Albumin- oder Insulin-Produktion einer vormaligen Stammzelle nicht immer auf Fusion mit einer Hepatozyten- oder β -Zelle zurückzuführen ist. Gerade in entwicklungsbiologischen Modellen, bei denen keine Läsion eingesetzt wurde, konnte die Fusion häufig ausgeschlossen werden (Almeida-Porada *et al.* 2004, Kogler, 2004 #68)

Auch ist unwahrscheinlich, dass es sich bei Stammzellpopulationen, welche durch Kultivierung generiert wurden (MSC, USSC) um heterogene Populationen handelt. Durch die Kulturbedingungen ist normalerweise nur das Wachstum einer Zellart begünstigt. Heterogenität der Stammzellen ist nur bei frisch isoliertem Gewebe, oder unseparierten MNC zu erwarten.

Die bis jetzt veröffentlichten Arbeiten zeigen klar, dass sich die adulten Stammzellen im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen viel schwieriger differenzieren lassen und funktionelle *in vitro* Protokolle nur langsam Form annehmen. Solange es jedoch noch nicht möglich ist, ES-Zellen ausreichend nach differenzierten- und

undifferenzierten Zellen zu selektieren, können diese Zellen im Menschen nicht eingesetzt werden (Blyszczuk and Wobus 2004). Es besteht immer die Gefahr, dass selbst eine einzelne undifferenzierte Zelle unter Millionen anderen zur Ausbildung eines Karzinoms führt. Gerade die hohe Potenz der embryonalen Stammzellen macht hier einen klinischen Einsatz so schwierig. Zudem müssen für die autologe Transplantation von Stammzellen tausende Zelllinien mit unterschiedlichen HLA-Markern angelegt werden. Da dies ethisch kaum vertretbar ist, werden ES-Zellen auch in baldiger Zukunft nicht als Therapiemöglichkeit für den Menschen zur Verfügung stehen.

Durch adulte Stammzellen wurden bisher jedoch keine Karzinome hervorgerufen. Schlimmstenfalls sind die Zellen wirkungslos und werden aus dem Wirtsorganismus entfernt. Ob die eingesetzten Zellen, die in bestrahlten oder auch anderweitig geschädigten Tieren eingesetzt wurden, nun durch Transdifferenzierung oder durch Fusion zu einer Erneuerung des Gewebes geführt haben, spielt im Endeffekt für die Therapie eine untergeordnete Rolle. Solange durch die Gabe von adulten Stammzellen Krankheiten in ihrer Symptomatik verbessert, oder Organe partiell regeneriert werden können, ist das Ziel erreicht. Aus Korea wurde in diesem Zusammenhang erst kürzlich der Fall einer 37-jährigen Patientin mit einer Rückenmarksläsion bekannt. Der Frau wurden nach fast 20 Jahren der Lähmung MSC aus Nabelschnurblut transplantiert, was innerhalb von sieben Wochen zu einer Verbesserung der Querschnittlähmung führte (Kang *et al.* 2005). Nebenwirkungen oder Bildungen von Tumoren, wurden in dieser Fallanalyse bisher nicht beschrieben. In Knochenmarkspendезentralen und Stammzellbanken auf der ganzen Welt ist bis heute ein riesiger Pool an potentiellen Spendern oder kryokonservierten Zellen gespeichert. Die Chance auf eine gewebeverwandte Spende ist hier sehr hoch und der Einsatz dieser Zellen, gerade aus dem Nabelschnurblut ethisch unstrittig. Im Hinblick auf die endodermale Differenzierung stehen die adulten Stammzellen den Embryonalen zudem in nichts nach. Die Arbeiten über beide Stammzelltypen sind auf diesem Gebiet noch am Anfang und weit entfernt von der *in vitro* Generierung einer funktionellen Hepatozyten- oder β -Zelle. Der Nachweis von Albumin oder Insulin alleine reicht nicht aus. Wenn eine Zelle Insulin produziert, aber nicht auf die Glukose-Konzentration reagiert, so ist es keine funktionelle β -Zelle. Und wenn eine Zelle Albumin produziert, aber keine der Anderen vielfältigen Aufgaben einer

Leberzelle bewältigen kann, so ist es eben keine Hepatozyten-Zelle. Die diffizile *in vitro* Generierung ausgereifter Gewebezellen, wird auch in Zukunft noch mehr Verständnis über die Abläufe der embryonalen Entwicklung erfordern.

4.7 Ausblick

Der Nachweis, dass sich die USSC *in vivo* und *in vitro* in endodermaler Richtung differenzieren lässt, konnte in dieser Arbeit erbracht werden. *In vivo* eignete sich das Schafmodell mittelfristig für den Nachweis der Differenzierung in Hepatozyten der Leber. *In vitro* konnte mit Hilfe einer artifiziellen Kombination von Beschichtungen, Medien und Faktoren oder durch Cokultur mit endodermalen Zellen, eine Aktivierung verschiedener endodermaler Gene erreicht werden.

Die noch ungerichtete und nicht in Pankreas oder Leber unterteilbare Differenzierungsrichtung muss im Weiteren besser gesteuert werden. Die nächste Herausforderung muss nun sein, aus USSC funktionelle Hepatozyten und β -Zellen *in vitro* zu generieren. Da sowohl faktorinduzierte Differenzierung, wie auch Cokulturen gute Ergebnisse zeigten, sollten beide Ansätze miteinander kombiniert werden. USSC könnten dann zusammen mit endodermalen Zellen und mit Zusatz von Faktoren in geeignetem Medium auf Matrigel kultiviert werden. Auch wäre eine Cokultur der USSC mit Pankreas- und Lebergewebe in Kombination mit embryonalem Gewebe des Herzmesenchyms denkbar.

Zusätzlich ließe sich noch der Einfluss einer 3D-Struktur auf die Differenzierung untersuchen. Die Generierung von „hanging drops“ reicht in diesem Fall nicht aus. Eine „Spinner-Kultur“ könnte hier zum Erfolg führen, bei der einzelne endodermale Zellen mit USSC auf einem Schüttler kultiviert werden und sich so heterogene Zellaggregate bilden können. Der Wichtigkeit der Matrix- bzw. Zell/Zell-Kontakten würde hier Rechnung getragen.

Auch die Überexpression eines frühen endodermalen Genes erscheint sinnvoll, wenn diese durch eine virale Übertragung des Plasmides, statt der bisher eingesetzten Nukleofektion stattfindet.

Zudem könnten andere etablierte Tiermodelle eingesetzt werden. Seit langem werden Stammzellen in Versuchstiere injiziert, bei denen durch Streptozocin (auch Streptozotocin) die β -Zellen, oder durch CCL₄ die Hepatozyten zerstört wurden. Über

eine Kooperation mit einer Arbeitsgruppe in Pittsburgh sollen USSC über den Hauptpankreasgang (Abb.1.3) in das Pankreas von Streptozocin behandelten Mäusen injiziert werden. In diesem Modell könnten native, als auch vordifferenzierte USSC direkt in das läionierte Gewebe gegeben werden, um den Filtermechanismus der Lunge zu umgehen. In einer weiteren Kooperation sollen USSC in einem Leberschädigungsmodell in immundefizienten Mäusen (PfP/Rag2^{-/-}) eingesetzt werden. Die Läsion wird hier durch die Chemikalien Monocrotalin oder Isopropanolol mit zusätzlicher Hepatektomie hervorgerufen.

Zusammenfassung



In dieser Arbeit wurden 233 Nabelschnurblutpräparate aufgearbeitet, aus denen 94 USSC-Zelllinien generiert werden konnten. Ausgewählte Zelllinien wurden zudem phänotypisch charakterisiert und anschließend endodermal differenziert. Der Fokus lag dabei auf der Differenzierung der USSC in β -Zellen des Pankreas und in Hepatozyten des Lebergewebes. Zum Nachweis der Differenzierung durch eine veränderte Genexpression wurde die Methode der RT-PCR zur Analyse der Zellen auf mRNA-Ebene eingesetzt. Es wurden verschiedene Primer etabliert, welche sich zum Nachweis von insgesamt 15 endodermalen Genen eigneten. Mit Hilfe der RT-PCR ließen sich unterschiedliche Differenzierungsgrade sowie die Einordnung der Genexpression in Leber oder Pankreas nachweisen. Um zu überprüfen, welche Methode der Differenzierung für die USSC am besten geeignet ist, wurden breit gefächerte Ansätze verfolgt: Zum einen wurde die Induktion der Differenzierung durch verschiedene Kombinationen von Medien, Beschichtungen, Wachstumsfaktoren und speziellen Zusätzen initiiert. Zum anderen wurden Cokulturen mit Primärzellen endodermalen Ursprungs oder Leber- und Pankreasgewebe vom Schaf eingesetzt. In einer weiteren Cokultur wurde menschliches Gewebe aus einer Biopsie verwendet. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Überexpression des endodermalen Genes PAX4 auf die β -Zell-Differenzierung der USSC auswirkt. Ergänzend wurde die *in vivo* Differenzierung von USSC in Leber- oder Pankreasgewebe mit Hilfe zweier Tiermodelle untersucht.

Durch die faktorinduzierte Differenzierung sowie durch die Cokulturen konnte in den USSC durch *in vitro* Differenzierung eine Expression von 11 der 15 untersuchten endodermalen Gene induziert werden. Damit konnte die USSC in mehreren Experimenten in eine endodermale Progenitorzelle mit verschiedenen Eigenschaften differenziert werden. Unter anderem wurden von den differenzierten USSC sowohl allgemeine endodermale Gene, als auch spezifische nur auf Leber oder Pankreas zurückzuführende Gene, exprimiert. In einem der Tiermodelle konnte zudem nach Transplantation von USSC im Serum des Tieres humanes Albumin nachgewiesen werden. Das andere Tiermodell, sowie die Überexpression mit PAX4 führte zu keiner Veränderung der Genexpression in endodermaler Richtung.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die USSC sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* in endodermaler Richtung differenziert werden konnten. Aus dem in dieser Arbeit generierten endodermalen Progenitor könnte durch weitere Verbesserung der Protokolle in Zukunft eine spezifische Leber- oder Pankreazelle hervorgehen.

Übersicht der faktorinduzierten Differenzierung:

Nr.	Beschichtung	Zelle	Medium	FCS	Zusatz	Faktoren I	Faktoren II	Dauer
1/1	Fibronektin	SA 068 P.7	X-Vivo 15	2%		Dexamethason 10-9 M / ml EGF,PDGF,LIF[je10ng/ml]		3 Wochen
1/2	Fibronektin	SA 068 P.7	X-Vivo 15	2%		Dexamethason 10-9 M / ml EGF,PDGF,LIF[je10ng/ml]	Dexamethason 10-9 M / ml FGF-4,HGF[je10ng/ml]	3 Wochen
1/3	Fibronektin	SA 068 P.7	X-Vivo 15	2%		Dexamethason 10-9 M / ml EGF,PDGF,IGF-1[je10ng/ml]		3 Wochen
1/4	Fibronektin	SA 068 7.P	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng / ml		3 Wochen
1/5	Fibronektin	SA 068 7.P	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng / ml		3 Wochen
2/1		SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	6 Wochen
2/2	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	6 Wochen
2/3	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	6 Wochen
2/4	Laminin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	6 Wochen
2/5	Laminin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	6 Wochen
3/1	Fibronektin	SA078 P.4	Neurobasal		B27			4 Wochen
3/2	Fibronektin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml		4 Wochen
3/3	Fibronektin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	Nikotinamid 10mM/ml		4 Wochen
3/4	Fibronektin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/5	Fibronektin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/6	Laminin	SA078 P.4	Neurobasal		B27			4 Wochen
3/7	Laminin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml		4 Wochen
3/8	Laminin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	Nikotinamid 10mM/ml		4 Wochen
3/9	Laminin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/10	Laminin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/11	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%				4 Wochen
3/12	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		bFGF 10 ng/ml		4 Wochen
3/13	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		Nikotinamid 10mM/ml		4 Wochen
3/14	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/15	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/16	Laminin	SA078 P.4	DMEM	2%				4 Wochen
3/17	Laminin	SA078 P.4	DMEM	2%		bFGF 10 ng/ml		4 Wochen
3/18	Laminin	SA078 P.4	DMEM	2%		Nikotinamid 10mM/ml		4 Wochen
3/19	Laminin	SA078 P.4	DMEM	2%		bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/20	Laminin	SA078 P.4	DMEM	2%		bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
3/21	Fibronektin	SA078 P.4	Neurobasal		B27	HGF 20 ng/ml		4 Wochen
3/22	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		HGF 20 ng/ml		4 Wochen
3/23	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		HGF 20 ng/ml Nikotinamid 10mM/ml		4 Wochen
3/24	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		NGF 100 ng/ml		4 Wochen
3/25	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		NGF 100 ng/ml Nikotinamid 10mM/ml		4 Wochen
3/26	Fibronektin	SA078 P.4	DMEM	2%		HGF 20 ng/ml NGF 100 ng/ml		4 Wochen
4/1	Fibronektin	SA061 P.7	Knockout High	SR		HGF 20 ng/ml		2 Wochen
4/2	Fibronektin	SA061 P.7	Knockout High	SR		NGF 100 ng/ml		2 Wochen
4/3	Laminin	SA061 P.7	Knockout High	SR		HGF 20 ng/ml		2 Wochen
4/4	Laminin	SA061 P.7	Knockout High	SR		NGF 100 ng/ml		2 Wochen
4/5	Fibronektin	SA061 P.7	Knockout Low	SR		HGF 20 ng/ml		2 Wochen
4/6	Fibronektin	SA061 P.7	Knockout Low	SR		NGF 100 ng/ml		2 Wochen
4/7	Laminin	SA061 P.7	Knockout Low	SR		HGF 20 ng/ml		2 Wochen
4/8	Laminin	SA061 P.7	Knockout Low	SR		NGF 100 ng/ml		2 Wochen
4/9		SA061 P.7	DMEM	2%				5 Wochen
4/10	Fibronektin	SA061 P.7	DMEM	2%				5 Wochen
4/11	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27			5 Wochen
4/12	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	1 Woche
4/13	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	2 Wochen
4/14	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	3 Wochen
4/15	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	4 Wochen
4/16	Fibronektin	SA061 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nikotinamid 10mM/ml	5 Wochen
4/17	Fibronektin	SA061 P.7	DMEM	2%		2% Leber Verdau		3 Wochen
5/1	Fibronektin	SA033 P.7	Neurobasal		B27	HGF 20 ng/ml		3 Wochen
5/2	Fibronektin	SA033 P.7	Neurobasal		B27	Nicotinamid 10mM		3 Wochen
5/3	Fibronektin	SA033 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml		3 Wochen
5/4	Fibronektin	SA033 P.7	Neurobasal		B27	bFGF 10 ng/ml	Nicotinamid 10mM	3 Wochen
5/5	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%		Leberverdau 2%		3 Wochen
5/6	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%				3 Wochen
5/7	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%				3 Wochen
5/8	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%		bFGF 10 ng/ml Dexamethason 10-9M/ml Ascorbinsäure 0,1mM		3 Wochen

Nr.	Beschichtung	Zelle	Medium	FCS	Zusatz	Faktoren I	Faktoren II	Dauer
5/9	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%		Dexamethason 10-9 M / ml EGF,PDGF,LIF[je10ng/ml]		3 Wochen
5/10	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%		Dexamethason 10-9 M/ml EGF,PDGF,LIF[je10ng/ml]	Dexamethason 10-9 M/ml FGF-4,HGF[je10ng/ml]	3 Wochen
5/11	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%		Dexamethason 10-9 M / ml EGF,PDGF,IGF-1[je10ng/ml]		3 Wochen
5/12		SA033 P.7	DMEM	2%				3 Wochen
5/13	Fibronektin	SA033 P.7	DMEM	2%				3 Wochen
5/14	Fibronektin	SA033 P.7	Knockout HIGH	SR		HGF 20 ng/ml		3 Wochen
5/15	Fibronektin	SA033 P.7	Knockout HIGH	SR		NGF 100 ng/ml		3 Wochen
5/16	Fibronektin	SA033 P.7	Knockout HIGH	SR				3 Wochen
5/17	Fibronektin	SA033 P.7	Knockout LOW	SR		HGF 20 ng/ml		3 Wochen
5/18	Fibronektin	SA033 P.7	Knockout LOW	SR		NGF 100 ng/ml		3 Wochen
5/19	Fibronektin	SA033 P.7	Knockout LOW	SR				3 Wochen
7/1	Fibronektin	SA 203 P.3	DMEM	2%				4 Wochen
7/2	Fibronektin	SA 203 P.3	DMEM	2%		FGF4 10 ng/ml	HGF 20 ng/ml	4 Wochen
7/7	Laminin	SA 203 P.3	DMEM	2%				4 Wochen
7/8	Laminin	SA 203 P.3	DMEM	2%		FGF4 10 ng/ml	HGF 20 ng/ml	4 Wochen
7/9	Laminin	SA 203 P.3				HepG2 Überstand		4 Wochen
7/10	Laminin	SA 097 P.4	DMEM	2%				4 Wochen
7/11	Laminin	SA 097 P.4	DMEM	2%		FGF4 10 ng/ml	HGF 20 ng/ml	4 Wochen
7/12	Laminin	SA 097 P.4				HepG2 Überstand		4 Wochen
7/13	Matrigel 1%	SA 203 P.3	DMEM	2%				4 Wochen
7/14	Matrigel 1%	SA 203 P.3	DMEM	2%		FGF4 10 ng/ml	HGF 20 ng/ml	4 Wochen
7/19	Matrigel 5%	SA 203 P.3	DMEM	2%				4 Wochen
7/20	Matrigel 5%	SA 203 P.3	DMEM	2%		FGF4 10 ng/ml	HGF 20 ng/ml	4 Wochen
8/1	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM	5%				3 Wochen
8/2	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM	5%				3 Wochen
8/4	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM	5%				3 Wochen
8/5	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM	5%		bFGF [50 ng/ml]		3 Wochen
8/6	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM	5%		bFGF [50 ng/ml]		3 Wochen
8/8	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM	5%		bFGF [50 ng/ml]		3 Wochen
8/9	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2			3 Wochen
8/10	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2			3 Wochen
8/12	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2			3 Wochen
8/13	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	bFGF [50 ng/ml]		3 Wochen
8/14	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	bFGF [50 ng/ml]		3 Wochen
8/16	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	bFGF [50 ng/ml]		3 Wochen
8/17	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	FGF4 [25ng/ml]		3 Wochen
8/18	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	FGF4 [25ng/ml]		3 Wochen
8/20	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	FGF4 [25ng/ml]		3 Wochen
8/21	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	HGF/FGF4[je10ng/ml]+Dexa10-6		3 Wochen
8/22	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	HGF/FGF4[je10ng/ml]+Dexa10-6		3 Wochen
8/24	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	HGF/FGF4[je10ng/ml]+Dexa10-6		3 Wochen
8/25	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	HGF / bmp2 [je10ng/ml]		3 Wochen
8/26	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	HGF / bmp2 [je10ng/ml]		3 Wochen
8/28	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	HGF / bmp2 [je10ng/ml]		3 Wochen
8/29	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	NGF [100 ng/ml]		3 Wochen
8/30	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	NGF [100 ng/ml]		3 Wochen
8/32	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	NGF [100 ng/ml]		3 Wochen
8/33	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	PDGF/EGF/IGF je [10ng/ml]		3 Wochen
8/34	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	PDGF/EGF/IGF je [10ng/ml]		3 Wochen
8/36	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	PDGF/EGF/IGF je [10ng/ml]		3 Wochen
8/37	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	PDGF/EGF/LIF je [10ng/ml]		3 Wochen
8/38	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	PDGF/EGF/LIF je [10ng/ml]		3 Wochen
8/40	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	PDGF/EGF/LIF je [10ng/ml]		3 Wochen
8/41	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM	5%		bFGF [25 ng/ml]	Nicotinamid [10mM]	3 Wochen
8/42	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM	5%		bFGF [25 ng/ml]	Nicotinamid [10mM]	3 Wochen
8/44	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM	5%		bFGF [25 ng/ml]	Nicotinamid [10mM]	3 Wochen
8/45	Matrigel 1%	SA207+SA225 P.6	DMEM		B27/N2	bFGF [25 ng/ml]	Nicotinamid [10mM]	3 Wochen
8/46	Matrigel 1%	SA277+SA282 P.3	DMEM		B27/N2	bFGF [25 ng/ml]	Nicotinamid [10mM]	3 Wochen
8/48	Matrigel 1%	BMMSC P.5	DMEM		B27/N2	bFGF [25 ng/ml]	Nicotinamid [10mM]	3 Wochen
8/49		SA207			B27/N2			Tag 0 K
8/50		SA225						Tag 0 K
8/51		SA277						Tag 0 K
8/52		SA282						Tag 0 K
8/53		BMMSC P.5						Tag 0 K
9/0		SA296 P.4	DMEM					Tag 0 K
9/1		SA296 P.4	DMEM		N2			2 Wochen
9/2		SA296 P.4	DMEM		N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
9/3		SA296 P.4	DMEM		N2	20 ng/ml HGF/ 5*10-7 M Dexa		2 Wochen
9/4	Matrigel 1%	SA296 P.4	DMEM		N2			2 Wochen

Nr.	Beschichtung	Zelle	Medium	FCS	Zusatz	Faktoren I	Faktoren II	Dauer
9/5	Matrigel 1%	SA296 P.4	DMEM		N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
9/6	Matrigel 1%	SA296 P.4	DMEM		N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/A		SA325 P.9						Tag0 K
10/1	Matrigel 2%	SA325 P.9	DMEM		N2			2 Wochen
10/2	Matrigel 2%	SA325 P.9	DMEM		N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/3	Matrigel 2%	SA325 P.9	DMEM		N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/4		SA325 P.9	DMEM		N2			2 Wochen
10/5		SA325 P.9	DMEM		N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/6		SA325 P.9	DMEM		N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/7	Matrigel 2%	SA325 P.9	DMEM	5%	N2			2 Wochen
10/8	Matrigel 2%	SA325 P.9	DMEM	5%	N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/9	Matrigel 2%	SA325 P.9	DMEM	5%	N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/10		SA325 P.9	DMEM	5%	N2			2 Wochen
10/11		SA325 P.9	DMEM	5%	N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/12		SA325 P.9	DMEM	5%	N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/13	Matrigel 2%	SA325 P.9	DMEM	5%	N2	20 ng/ml Oncostatin		2 Wochen
10/16		SA325 P.9	DMEM	5%	N2	20 ng/ml Oncostatin		2 Wochen
10/B		SA296 P.6						Tag0 K
10/19	Matrigel 2%	SA296 P.6	DMEM	-	N2			2 Wochen
10/20	Matrigel 2%	SA296 P.6	DMEM	-	N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/21	Matrigel 2%	SA296 P.6	DMEM	-	N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/22		SA296 P.6	DMEM	-	N2			2 Wochen
10/23		SA296 P.6	DMEM	-	N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/24		SA296 P.6	DMEM	-	N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/25	Matrigel 2%	SA296 P.6	DMEM	5%	N2			2 Wochen
10/26	Matrigel 2%	SA296 P.6	DMEM	5%	N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/27	Matrigel 2%	SA296 P.6	DMEM	5%	N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/28		SA296 P.6	DMEM	5%	N2			2 Wochen
10/29		SA296 P.6	DMEM	5%	N2	20 ng/ml FGF4 + 20 ng/ml HGF		2 Wochen
10/30		SA296 P.6	DMEM	5%	N2	20 ng/ml HGF/ 5*10 ⁻⁷ M Dexa		2 Wochen
10/31	Matrigel 2%	SA296 P.6	DMEM	5%	N2	20 ng/ml Oncostatin		2 Wochen
10/34		SA296 P.6	DMEM	5%	N2	20 ng/ml Oncostatin		2 Wochen
11/1		SA296 P.4	DMEM	5%				8 Tage
11/2		SA296 P.4	DMEM	5%		OSM [10ng/ml]		8 Tage
11/4		SA296 P.4	DMEM	5%		OSM [50ng/ml]		8 Tage
11/6		SA296 P.4	DMEM	5%		OSM [500ng/ml]		8 Tage
12/1		SA296 P.7	DMEM	5%				4 Wochen
12/2		SA296 P.7	DMEM	5%		OSM [10ng/ml]		4 Wochen
12/3		SA296 P.7	DMEM	5%		OSM [100 ng/ml]		4 Wochen
12/4		SA296 P.7	DMEM	5%		OSM [1000 ng/ml]		4 Wochen
12/5		SA236 P.7	DMEM	5%				4 Wochen
12/6		SA236 P.7	DMEM	5%		OSM [10ng/ml]		4 Wochen
12/7		SA236 P.7	DMEM	5%		OSM [100 ng/ml]		4 Wochen
12/8		SA236 P.7	DMEM	5%		OSM [1000 ng/ml]		4 Wochen
13/4		SA073 P.7	IMEM	10 %	ITS			4 Wochen
13/5		SA073 P.7	IMEM	10 %	ITS	5x10 ⁻⁷ Dexa + 50 ng/ml HGF		4 Wochen
13/6		SA073 P.7	IMEM	10 %	ITS	5x10 ⁻⁷ Dexa + 50 ng/ml HGF	5x10 ⁻⁷ Dexa+50ng/ml OSM	4 Wochen
14/A		SA5/03 P.8						Tag0 K
14/1		SA5/03 P.8	DMEM	10 %				4 Wochen
14/2		SA5/03 P.8	IMEM	10 %	ITS			4 Wochen
14/3		SA5/03 P.8	IMEM	10 %	ITS	5x10 ⁻⁷ Dexa + 50 ng/ml HGF		4 Wochen
14/4		SA5/03 P.8	IMEM	10 %	ITS	5x10 ⁻⁷ Dexa + 50 ng/ml HGF	5x10 ⁻⁷ Dexa+50ng/ml OSM	4 Wochen
14/B		SA325 P.8						Tag0 K
14/5		SA325 P.8	DMEM	10 %				4 Wochen
14/6		SA325 P.8	IMEM	10 %	ITS			4 Wochen
14/7		SA325 P.8	IMEM	10 %	ITS	5x10 ⁻⁷ Dexa + 50 ng/ml HGF		4 Wochen
14/8		SA325 P.8	IMEM	10 %	ITS	5x10 ⁻⁷ Dexa + 50 ng/ml HGF	5x10 ⁻⁷ Dexa+50ng/ml OSM	4 Wochen
RA1		SA4/146 P.5	DMEM	30%				7 Tage
RA2		SA4/146 P.5	DMEM	30%		10µM Retinolsäure		1Tag
RA3		SA4/146 P.5	DMEM	30%		10µM Retinolsäure		3 Tage
RA4		SA4/146 P.5	DMEM	30%		10µM Retinolsäure		7 Tage
RA5		SA4/146 P.5	DMEM					7 Tage
RA6		SA4/146 P.5	DMEM			10µM Retinolsäure		1Tag
RA7		SA4/146 P.5	DMEM			10µM Retinolsäure		3 Tage
RA8		SA4/146 P.5	DMEM			10µM Retinolsäure		7 Tage

Übersicht über die verschiedenen Kokulturen:

Nr.	Zelle	Typ	CoK Zelle	Sonstiges*	Medium	Schale	Dauer
CoK1/ 1	SA061 P.5				HCM	6-well	1 Woche
CoK1/ 2	SA061 P.5				DMEM+10%FCS	6-well	1 Woche
CoK1/ 3	SA061 P.5	dCoK	rHeps		HCM	6-well	1 Woche
CoK1/ 4	SA061 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	1 Woche
CoK1/ 5	SA061 P.5	TW	rHeps		HCM	6-well	1 Woche
CoK1/ 6	SA061 P.5	TW	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	1 Woche
CoK1/ 7	SA073 P.5				HCM	6-well	1 Woche
CoK1/ 8	SA073 P.5				DMEM+10%FCS	6-well	1 Woche
CoK1/ 9	SA073 P.5	dCoK	rHeps		HCM	6-well	1 Woche
CoK1/ 10	SA073 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	1 Woche
CoK1/ 11	SA073 P.5	TW	rHeps		HCM	6-well	1 Woche
CoK1/ 12	SA073 P.5	TW	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	1 Woche
CoK1/ 13	SA061 P.5				HCM	6-well	2 Wochen
CoK1/ 14	SA061 P.5				DMEM+10%FCS	6-well	2 Wochen
CoK1/ 15	SA061 P.5	dCoK	rHeps		HCM	6-well	2 Wochen
CoK1/ 16	SA061 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	2 Wochen
CoK1/ 17	SA061 P.5	TW	rHeps		HCM	6-well	2 Wochen
CoK1/ 18	SA061 P.5	TW	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	2 Wochen
CoK1/ 19	SA073 P.5				HCM	6-well	2 Wochen
CoK1/ 20	SA073 P.5				DMEM+10%FCS	6-well	2 Wochen
CoK1/ 21	SA073 P.5	dCoK	rHeps		HCM	6-well	2 Wochen
CoK1/ 22	SA073 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	2 Wochen
CoK1/ 23	SA073 P.5	TW	rHeps		HCM	6-well	2 Wochen
CoK1/ 24	SA073 P.5	TW	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	2 Wochen
CoK1/ 25	SA061 P.5				HCM	6-well	3 Wochen
CoK1/ 26	SA061 P.5				DMEM+10%FCS	6-well	3 Wochen
CoK1/ 27	SA061 P.5	dCoK	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK1/ 28	SA061 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	3 Wochen
CoK1/ 29	SA061 P.5	TW	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK1/ 30	SA061 P.5	TW	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	3 Wochen
CoK1/ 31	SA073 P.5				HCM	6-well	3 Wochen
CoK1/ 32	SA073 P.5				DMEM+10%FCS	6-well	3 Wochen
CoK1/ 33	SA073 P.5	dCoK	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK1/ 34	SA073 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	3 Wochen
CoK1/ 35	SA073 P.5	TW	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK1/ 36	SA073 P.5	TW	rHeps		DMEM+10%FCS	6-well	3 Wochen
CoK1/ 37	SA061 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	Slide	1 Woche
CoK1/ 38	SA061 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	Slide	2 Wochen
CoK1/ 39	SA061 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	Slide	3 Wochen
CoK1/ 40	SA061 P.5	dCoK	rHeps		HCM	Slide	1 Woche
CoK1/ 41	SA061 P.5	dCoK	rHeps		HCM	Slide	2 Wochen
CoK1/ 42	SA061 P.5	dCoK	rHeps		HCM	Slide	3 Wochen
CoK1/ 43	SA061 P.5				DMEM+10%FCS	Slide	1 Woche
CoK1/ 44	SA061 P.5				DMEM+10%FCS	Slide	2 Wochen
CoK1/ 45	SA061 P.5				DMEM+10%FCS	Slide	3 Wochen
CoK1/ 46	SA061 P.5				HCM	Slide	1 Woche
CoK1/ 47	SA061 P.5				HCM	Slide	2 Wochen
CoK1/ 48	SA061 P.5				HCM	Slide	3 Wochen
CoK1/ 49	SA073 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	Slide	1 Woche
CoK1/ 50	SA073 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	Slide	2 Wochen
CoK1/ 51	SA073 P.5	dCoK	rHeps		DMEM+10%FCS	Slide	3 Wochen
CoK1/ 52	SA073 P.5	dCoK	rHeps		HCM	Slide	1 Woche
CoK1/ 53	SA073 P.5	dCoK	rHeps		HCM	Slide	2 Wochen
CoK1/ 54	SA073 P.5	dCoK	rHeps		HCM	Slide	3 Wochen
CoK1/ 55	SA073 P.5				DMEM+10%FCS	Slide	1 Woche
CoK1/ 56	SA073 P.5				DMEM+10%FCS	Slide	2 Wochen
CoK1/ 57	SA073 P.5				DMEM+10%FCS	Slide	3 Wochen
CoK1/ 58	SA073 P.5				HCM	Slide	1 Woche
CoK1/ 59	SA073 P.5				HCM	Slide	2 Wochen
CoK1/ 60	SA073 P.5				HCM	Slide	3 Wochen
CoK2/ 1	SA296/073/061			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 2	SA296/073/061	dCoK	rHeps	MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 3	rHeps			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 4	SA296/073/061			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 5	SA296/073/061	dCoK	rHeps	MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 6	rHeps			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 7	SA296/073/061			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 8	SA296/073/061	dCoK	rHeps	MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 9	rHeps			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 10	SA296/073/061			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 11	SA296/073/061	dCoK	rHeps	MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 12	rHeps			MG1%	HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 13	SA296/073/061				HCM	Slide	2 Wochen

Nr.	Zelle	Typ	CoK Zelle	Sonstiges*	Medium	Schale	Dauer
CoK2/ 14	SA296/073/061	dCoK	rHeps		HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 15	rHeps				HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 16	SA296/073/061				HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 17	SA296/073/061	dCoK	rHeps		HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 18	rHeps				HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 19	SA296/073/061				HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 20	SA296/073/061	dCoK	rHeps		HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 21	rHeps				HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 22	SA296/073/061				HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 23	SA296/073/061	dCoK	rHeps		HCM	Slide	2 Wochen
CoK2/ 24	rHeps				HCM	Slide	2 Wochen
CoK3/ 1	SA325 P.8				DMEM+10%	6-well	1 Woche
CoK3/ 2	SA325 P.8				DMEM+10%	6-well	2 Wochen
CoK3/ 3	SA325 P.8				DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK3/ 4	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	1 Woche
CoK3/ 5	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	2 Wochen
CoK3/ 6	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK3/ 7	SA325 P.8				HCM	6-well	1 Woche
CoK3/ 8	SA325 P.8				HCM	6-well	2 Wochen
CoK3/ 9	SA325 P.8				HCM	6-well	3 Wochen
CoK3/ 10	SA325 P.8	dCoK	rHeps		HCM	6-well	1 Woche
CoK3/ 11	SA325 P.8	dCoK	rHeps		HCM	6-well	2 Wochen
CoK3/ 12	SA325 P.8	dCoK	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK3/ 13	SA4/78 P.6				DMEM+10%	6-well	1 Woche
CoK3/ 14	SA4/78 P.6				DMEM+10%	6-well	2 Wochen
CoK3/ 15	SA4/78 P.6				DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK3/ 16	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	1 Woche
CoK3/ 17	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	2 Wochen
CoK3/ 18	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK3/ 19	SA4/78 P.6				HCM	6-well	1 Woche
CoK3/ 20	SA4/78 P.6				HCM	6-well	2 Wochen
CoK3/ 21	SA4/78 P.6				HCM	6-well	3 Wochen
CoK3/ 22	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		HCM	6-well	1 Woche
CoK3/ 23	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		HCM	6-well	2 Wochen
CoK3/ 24	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK3/ 25	SA5/03 P.7				DMEM+10%	6-well	1 Woche
CoK3/ 26	SA5/03 P.7				DMEM+10%	6-well	2 Wochen
CoK3/ 27	SA5/03 P.7				DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK3/ 28	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	1 Woche
CoK3/ 29	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	2 Wochen
CoK3/ 30	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK3/ 31	SA5/03 P.7				HCM	6-well	1 Woche
CoK3/ 32	SA5/03 P.7				HCM	6-well	2 Wochen
CoK3/ 33	SA5/03 P.7				HCM	6-well	3 Wochen
CoK3/ 34	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	6-well	1 Woche
CoK3/ 35	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	6-well	2 Wochen
CoK3/ 36	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK3/ 37	SA325 P.8				DMEM+10%	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 38	SA325 P.8				DMEM+10%	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 39	SA325 P.8				DMEM+10%	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 40	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 41	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 42	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 43	SA325 P.8				HCM	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 44	SA325 P.8				HCM	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 45	SA325 P.8				HCM	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 46	SA325 P.8	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 47	SA325 P.8	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 48	SA325 P.8	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 49	SA4/78 P.6				DMEM+10%	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 50	SA4/78 P.6				DMEM+10%	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 51	SA4/78 P.6				DMEM+10%	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 52	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 53	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 54	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 55	SA4/78 P.6				HCM	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 56	SA4/78 P.6				HCM	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 57	SA4/78 P.6				HCM	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 58	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 59	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 60	SA4/78 P.6	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 61	SA5/03 P.7				DMEM+10%	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 62	SA5/03 P.7				DMEM+10%	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 63	SA5/03 P.7				DMEM+10%	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 64	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 65	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	2 Wochen

Nr.	Zelle	Typ	CoK Zelle	Sonstiges*	Medium	Schale	Dauer
CoK3/ 66	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 67	SA5/03 P.7				HCM	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 68	SA5/03 P.7				HCM	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 69	SA5/03 P.7				HCM	4er Slide	3 Wochen
CoK3/ 70	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	1 Woche
CoK3/ 71	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	2 Wochen
CoK3/ 72	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	4er Slide	3 Wochen
CoK4/ 1	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps	Stauro	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 2	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps		HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 3	SA 4/94 P.7				HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 4	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps	Stauro	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 5	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps		HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 6	SA 5/03 P.6				HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 7	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps	Stauro	HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 8	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps		HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 9	SA 4/94 P.7				HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 10	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps	Stauro	HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 11	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps		HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 12	SA 5/03 P.6				HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 13	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps	Stauro/Col.I	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 14	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps	Col.I	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 15	SA 4/94 P.7			Col.I	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 16	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps	Stauro/Col.I	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 17	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps	Col.I	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 18	SA 5/03 P.6			Col.I	HCM	6-well	3 Tage
CoK4/ 19	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps	Stauro/Col.I	HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 20	SA 4/94 P.7	dCoK	rHeps	Col.I	HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 21	SA 4/94 P.7			Col.I	HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 22	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps	Stauro/Col.I	HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 23	SA 5/03 P.6	dCoK	rHeps	Col.I	HCM	6-well	11 Tage
CoK4/ 24	SA 5/03 P.6			Col.I	HCM	6-well	11 Tage
CoK5/ 1	SA5/03 P.7				DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK5/ 2	SA5/03 P.7				DMEM+10%	100mm	7 Tage
CoK5/ 3	SA5/03 P.7				DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 4	SA5/03 P.7				DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 5	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK5/ 6	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	7 Tage
CoK5/ 7	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 8	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 9	SA5/03 P.7				HCM	100mm	1 Tag
CoK5/ 10	SA5/03 P.7				HCM	100mm	7 Tage
CoK5/ 11	SA5/03 P.7				HCM	100mm	12 Tage
CoK5/ 12	SA5/03 P.7				HCM	100mm	12 Tage
CoK5/ 13	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	1 Tag
CoK5/ 14	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	7 Tage
CoK5/ 15	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	12 Tage
CoK5/ 16	SA5/03 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	12 Tage
CoK5/ 17	SA073 P.7				DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK5/ 18	SA073 P.7				DMEM+10%	100mm	7 Tage
CoK5/ 19	SA073 P.7				DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 20	SA073 P.7				DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 21	SA073 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK5/ 22	SA073 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	7 Tage
CoK5/ 23	SA073 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 24	SA073 P.7	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	12 Tage
CoK5/ 25	SA073 P.7				HCM	100mm	1 Tag
CoK5/ 26	SA073 P.7				HCM	100mm	7 Tage
CoK5/ 27	SA073 P.7				HCM	100mm	12 Tage
CoK5/ 28	SA073 P.7				HCM	100mm	12 Tage
CoK5/ 29	SA073 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	1 Tag
CoK5/ 30	SA073 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	7 Tage
CoK5/ 31	SA073 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	12 Tage
CoK5/ 32	SA073 P.7	dCoK	rHeps		HCM	100mm	12 Tage
CoK6/ 1	SA5/03 P.8				DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK6/ 2	SA5/03 P.8				DMEM+10%	100mm	1 Woche
CoK6/ 3	SA5/03 P.8				DMEM+10%	100mm	3 Wochen
CoK6/ 4	SA5/03 P.8				DMEM+10%	100mm	6 Wochen
CoK6/ 5	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK6/ 6	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	1 Woche
CoK6/ 7	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	3 Wochen
CoK6/ 8	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	6 Wochen
CoK6/ 9	SA5/03 P.8				HCM	100mm	1 Tag
CoK6/ 10	SA5/03 P.8				HCM	100mm	1 Woche
CoK6/ 11	SA5/03 P.8				HCM	100mm	3 Wochen
CoK6/ 12	SA5/03 P.8				HCM	100mm	6 Wochen
CoK6/ 13	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		HCM	100mm	1 Tag

Nr.	Zelle	Typ	CoK Zelle	Sonstiges*	Medium	Schale	Dauer
CoK6/ 14	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		HCM	100mm	1 Woche
CoK6/ 15	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		HCM	100mm	3 Wochen
CoK6/ 16	SA5/03 P.8	dCoK	rHeps		HCM	100mm	6 Wochen
CoK6/ 17	SA325 P.8				DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK6/ 18	SA325 P.8				DMEM+10%	100mm	1 Woche
CoK6/ 19	SA325 P.8				DMEM+10%	100mm	3 Wochen
CoK6/ 20	SA325 P.8				DMEM+10%	100mm	6 Wochen
CoK6/ 21	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	1 Tag
CoK6/ 22	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	1 Woche
CoK6/ 23	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	3 Wochen
CoK6/ 24	SA325 P.8	dCoK	rHeps		DMEM+10%	100mm	6 Wochen
CoK6/ 25	SA325 P.8				HCM	100mm	1 Tag
CoK6/ 26	SA325 P.8				HCM	100mm	1 Woche
CoK6/ 27	SA325 P.8				HCM	100mm	3 Wochen
CoK6/ 28	SA325 P.8				HCM	100mm	6 Wochen
CoK6/ 29	SA325 P.8		rHeps		HCM	100mm	1 Tag
CoK6/ 30	SA325 P.8		rHeps		HCM	100mm	1 Woche
CoK6/ 31	SA325 P.8		rHeps		HCM	100mm	3 Wochen
CoK6/ 32	SA325 P.8		rHeps		HCM	100mm	6 Wochen
CoK6/ A	SA5/03 P.8	TW	rHeps		DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK6/ B	SA5/03 P.8	TW	rHeps		DMEM+10%	6-well	6 Wochen
CoK6/ C	SA5/03 P.8	TW	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK6/ D	SA5/03 P.8	TW	rHeps		HCM	6-well	6 Wochen
CoK6/ E	SA325 P.8	TW	rHeps		DMEM+10%	6-well	3 Wochen
CoK6/ F	SA325 P.8	TW	rHeps		DMEM+10%	6-well	6 Wochen
CoK6/ G	SA325 P.8	TW	rHeps		HCM	6-well	3 Wochen
CoK6/ H	SA325 P.8	TW	rHeps		HCM	6-well	6 Wochen
CoKA/ 1	SA5/03P.8				DMEM+10%	6-well	10 Tage
CoKA/ 2	SA5/03P.8	dCoK	Schafleber		DMEM+10%	6-well	10 Tage
CoKA/ 3	SA5/03P.8	TW	Schafleber		DMEM+10%	6-well	10 Tage
CoKA/ 4	SA5/03P.8				HCM	6-well	10 Tage
CoKA/ 5	SA5/03P.8	dCoK	Schafleber		HCM	6-well	10 Tage
CoKA/ 6	SA5/03P.8	TW	Schafleber		HCM	6-well	10 Tage
CoKA/ 7	SA4/78 P.7				DMEM+10%	6-well	10 Tage
CoKA/ 8	SA4/78 P.7	dCoK	Schafleber		DMEM+10%	6-well	10 Tage
CoKA/ 9	SA4/78 P.7	TW	Schafleber		DMEM+10%	6-well	10 Tage
CoKA/ 10	SA4/78 P.7				HCM	6-well	10 Tage
CoKA/ 11	SA4/78 P.7	dCoK	Schafleber		HCM	6-well	10 Tage
CoKA/ 12	SA4/78 P.7	TW	Schafleber		HCM	6-well	10 Tage
CoKA/ 13	SA5/03P.8	dCoK	Schafleber	hd200	HCM	24-well	10 Tage
CoKA/ 14	SA5/03P.8	dCoK	Schafleber	hd2000	HCM	24-well	10 Tage
CoKA/ 15	SA4/78 P.7	dCoK	Schafleber	hd200	HCM	24-well	10 Tage
CoKA/ 16	SA4/78 P.7	dCoK	Schafleber	hd2000	HCM	24-well	10 Tage
CoKB/ 1	SA4/146 P.5	CM	Schafleber		DMEM	100mm	1 Tag
CoKB/ 2	SA4/146 P.5	CM	Schafleber		DMEM	100mm	3 Tage
CoKB/ 3	SA4/146 P.5	CM	Schafleber		DMEM	100mm	7 Tage
CoKB/ 4	SA4/146 P.5				DMEM	100mm	7 Tage
CoKB/ 5	SA4/146 P.5	CM	Schafleber		DMEM + 5% FCS	100mm	1 Tag
CoKB/ 6	SA4/146 P.5	CM	Schafleber		DMEM + 5% FCS	100mm	3 Tage
CoKB/ 7	SA4/146 P.5	CM	Schafleber		DMEM + 5% FCS	100mm	7 Tage
CoKB/ 8	SA4/146 P.5				DMEM + 5% FCS	100mm	7 Tage
CoKC/ 1	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	DMEM	100mm	1 Tag
CoKC/ 2	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	DMEM	100mm	3 Tage
CoKC/ 3	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	DMEM	100mm	7 Tage
CoKC/ 4	SA5/03 P.4				DMEM	100mm	7 Tage
CoKC/ 5	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	DMEM + 5% FCS	100mm	1 Tag
CoKC/ 6	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	DMEM + 5% FCS	100mm	3 Tage
CoKC/ 7	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	DMEM + 5% FCS	100mm	7 Tage
CoKC/ 8	SA5/03 P.4				DMEM + 5% FCS	100mm	7 Tage
CoKC/ 9	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	HCM	100mm	1 Tag
CoKC/ 10	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	HCM	100mm	3 Tage
CoKC/ 11	SA5/03 P.4				HCM	100mm	7 Tage
CoKC/ 12	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	HBM	100mm	1 Tag
CoKC/ 13	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	HBM	100mm	3 Tage
CoKC/ 14	SA5/03 P.4	CM	Schafleber	RA	HBM	100mm	7 Tage
CoKC/ 15	SA5/03 P.4				HBM	100mm	7 Tage
CoKD/ 1	SA073 P.6				HCM	100mm	1 Tag
CoKD/ 2	SA073 P.6				DMEM+10%FCS	100mm	1 Tag
CoKD/ 3	SA073 P.6	TW	Schafleber		HCM	100mm	1 Tag
CoKD/ 4	SA073 P.6	TW	Schafleber		DMEM+10%FCS	100mm	1 Tag
CoKD/ 5	SA073 P.6	TW	Schafpankreas		HCM	100mm	1 Tag
CoKD/ 6	SA073 P.6	TW	Schafpankreas		DMEM+10%FCS	100mm	1 Tag
CoKD/ 7	SA073 P.6				HCM	100mm	4 Tage
CoKD/ 8	SA073 P.6				DMEM+10%FCS	100mm	4 Tage
CoKD/ 9	SA073 P.6	TW	Schafleber		HCM	100mm	4 Tage
CoKD/ 10	SA073 P.6	TW	Schafleber		DMEM+10%FCS	100mm	4 Tage

Nr.	Zelle	Typ	CoK Zelle	Sonstiges*	Medium	Schale	Dauer
CoKD/ 11	SA073 P.6	TW	Schafpankreas		HCM	100mm	4 Tage
CoKD/ 12	SA073 P.6	TW	Schafpankreas		DMEM+10%FCS	100mm	4 Tage
CoKD/ 13	SA073 P.6				HCM	100mm	8 Tage
CoKD/ 14	SA073 P.6				DMEM+10%FCS	100mm	8 Tage
CoKD/ 15	SA073 P.6	TW	Schafleber		HCM	100mm	8 Tage
CoKD/ 16	SA073 P.6	TW	Schafleber		DMEM+10%FCS	100mm	8 Tage
CoKD/ 17	SA073 P.6	TW	Schafpankreas		HCM	100mm	8 Tage
CoKD/ 18	SA073 P.6	TW	Schafpankreas		DMEM+10%FCS	100mm	8 Tage
CoKD/ 19	SA078 P.5				HCM	100mm	1 Tag
CoKD/ 20	SA078 P.5				DMEM+10%FCS	100mm	1 Tag
CoKD/ 21	SA078 P.5	TW	Schafleber		HCM	100mm	1 Tag
CoKD/ 22	SA078 P.5	TW	Schafleber		DMEM+10%FCS	100mm	1 Tag
CoKD/ 23	SA078 P.5	TW	Schafpankreas		HCM	100mm	1 Tag
CoKD/ 24	SA078 P.5	TW	Schafpankreas		DMEM+10%FCS	100mm	1 Tag
CoKD/ 25	SA078 P.5				HCM	100mm	4 Tage
CoKD/ 26	SA078 P.5				DMEM+10%FCS	100mm	4 Tage
CoKD/ 27	SA078 P.5	TW	Schafleber		HCM	100mm	4 Tage
CoKD/ 28	SA078 P.5	TW	Schafleber		DMEM+10%FCS	100mm	4 Tage
CoKD/ 29	SA078 P.5	TW	Schafpankreas		HCM	100mm	4 Tage
CoKD/ 30	SA078 P.5	TW	Schafpankreas		DMEM+10%FCS	100mm	4 Tage
CoKD/ 31	SA078 P.5				HCM	100mm	8 Tage
CoKD/ 32	SA078 P.5				DMEM+10%FCS	100mm	8 Tage
CoKD/ 33	SA078 P.5	TW	Schafleber		HCM	100mm	8 Tage
CoKD/ 34	SA078 P.5	TW	Schafleber		DMEM+10%FCS	100mm	8 Tage
CoKD/ 35	SA078 P.5	TW	Schafpankreas		HCM	100mm	8 Tage
CoKD/ 36	SA078 P.5	TW	Schafpankreas		DMEM+10%FCS	100mm	8 Tage
hCoKI/ 1	SA5/03 P.8				DMEM+10%FCS	6-well	11 Tage
hCoKI/ 2	SA5/03 P.8				HCM	6-well	11 Tage
hCoKI/ 3	SA5/03 P.8	TW	humane Leber		DMEM+10%FCS	6-well	11 Tage
hCoKI/ 4	SA5/03 P.8	TW	humane Leber		HCM	6-well	11 Tage
hCoKI/ 5	SA5/03 P.8	dCoK	humane Leber		DMEM	6-well	11 Tage
hCoKI/ 6	SA5/03 P.8	dCoK	humane Leber		DMEM+10%FCS	6-well	11 Tage

*MG1%=Matrigel Beschichtung, Col.I=Collagen I Beschichtung, Stauro=Staurosporin, hd=hangin drop mit 200oder 2000 Zellen pro Sphäre, RA=Retinolsäure

- Abraham, E. J., S. Kodama, et al. (2004). "Human pancreatic islet-derived progenitor cell engraftment in immunocompetent mice." *Am J Pathol* 164(3): 817-30.
- Airey, J. A., G. Almeida-Porada, et al. (2004). "Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart." *Circulation* 109(11): 1401-7.
- Alison, M. R., R. Poulsom, et al. (2000). "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." *Nature* 406(6793): 257.
- Almeida-Porada, G., C. D. Porada, et al. (2004). "Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep." *Blood* 104(8): 2582-90.
- Alvarez-Dolado, M., R. Pardal, et al. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." *Nature* 425(6961): 968-73.
- Apelqvist, A., H. Li, et al. (1999). "Notch signalling controls pancreatic cell differentiation." *Nature* 400(6747): 877-81.
- Assady, S., G. Maor, et al. (2001). "Insulin production by human embryonic stem cells." *Diabetes* 50(8): 1691-7.
- Barbash, I. M., P. Chouraqui, et al. (2003). "Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution." *Circulation* 108(7): 863-8.
- Bentzon, J. F., K. Stenderup, et al. (2005). "Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene." *Biochem Biophys Res Commun* 330(3): 633-40.
- Bhushan, A., N. Itoh, et al. (2001). "Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis." *Development* 128(24): 5109-17.
- Blyszczuk, P., J. Czyz, et al. (2003). "Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3): 998-1003.
- Blyszczuk, P. and A. M. Wobus (2004). "Stem cells and pancreatic differentiation in vitro." *J Biotechnol* 113(1-3): 3-13.
- Bonner-Weir, S. and A. Sharma (2002). "Pancreatic stem cells." *J Pathol* 197(4): 519-26.
- Bonner-Weir, S., M. Taneja, et al. (2000). "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7999-8004.
- Bonner-Weir, S. and G. C. Weir (2005). "New sources of pancreatic beta-cells." *Nat Biotechnol* 23(7): 857-61.

Literatur

- Chen, L. B., X. B. Jiang, et al. (2004). "Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells." *World J Gastroenterol* 10(20): 3016-20.
- Chinzei, R., Y. Tanaka, et al. (2002). "Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes." *Hepatology* 36(1): 22-9.
- Cras-Meneur, C., L. Elghazi, et al. (2001). "Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation." *Diabetes* 50(7): 1571-9.
- Czyz, J., C. Wiese, et al. (2003). "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro." *Biol Chem* 384(10-11): 1391-409.
- Dabeva, M. D., S. G. Hwang, et al. (1997). "Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14): 7356-61.
- Dor, Y., J. Brown, et al. (2004). "Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation." *Nature* 429(6987): 41-6.
- Duncan, S. A. (2003). "Mechanisms controlling early development of the liver." *Mech Dev* 120(1): 19-33.
- Eckfeldt, C. E., E. M. Mendenhall, et al. (2005). "The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(9): 726-37.
- Edlund, H. (2002). "Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy." *Nat Rev Genet* 3(7): 524-32.
- Fiegel, H. C., M. V. Lioznov, et al. (2003). "Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells." *Stem Cells* 21(1): 98-104.
- Flake, A. W., M. R. Harrison, et al. (1986). "Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras." *Science* 233(4765): 776-8.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, et al. (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." *Transplantation* 6(2): 230-47.
- Golosow, N. and C. Grobstein (1962). "Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis." *Dev Biol* 4: 242-55.
- Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." *J Exp Med* 183(4): 1797-806.
- Hamazaki, T., Y. Iiboshi, et al. (2001). "Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro." *FEBS Lett* 497(1): 15-9.
- Hansson, M., A. Tonning, et al. (2004). "Artificial insulin release from differentiated embryonic stem cells." *Diabetes* 53(10): 2603-9.

Literatur

- He, Z. P., W. Q. Tan, et al. (2004). "Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers." *Cell Prolif* 37(2): 177-87.
- Hess, D., L. Li, et al. (2003). "Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration." *Nat Biotechnol* 21(7): 763-70.
- Hong, S. H., E. J. Gang, et al. (2005). "In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells." *Biochem Biophys Res Commun* 330(4): 1153-61.
- Hori, Y., I. C. Rulifson, et al. (2002). "Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16105-10.
- Huang, H. P. and M. J. Tsai (2000). "Transcription factors involved in pancreatic islet development." *J Biomed Sci* 7(1): 27-34.
- Ianus, A., G. G. Holz, et al. (2003). "In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion." *J Clin Invest* 111(6): 843-50.
- Ishikawa, F., C. J. Drake, et al. (2003). "Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice." *Ann N Y Acad Sci* 996: 174-85.
- Ishizaka, S., A. Shiroy, et al. (2002). "Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene." *Faseb J* 16(11): 1444-6.
- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, et al. (2000). "Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers." *Mol Med* 6(2): 88-95.
- Jager, M., M. Sager, et al. (2004). "[In vivo and in vitro bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells]." *Orthopade* 33(12): 1361-72.
- Jang, Y. Y., M. I. Collector, et al. (2004). "Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion." *Nat Cell Biol* 6(6): 532-9.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* 418(6893): 41-9.
- Jiang, Y., B. Vaessen, et al. (2002). "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain." *Exp Hematol* 30(8): 896-904.
- Jones, E. A., D. Tosh, et al. (2002). "Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells." *Exp Cell Res* 272(1): 15-22.
- Kang, E. M., P. P. Zickler, et al. (2005). "Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established." *Exp Hematol* 33(6): 699-705.

Literatur

- Kang, K. S., S. Kim, et al. (2005). "A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study." *Cytotherapy* 7(4): 368-73.
- Kang, X. Q., W. J. Zang, et al. (2005). "Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro." *World J Gastroenterol* 11(22): 3479-84.
- Kania, G., P. Blyszczuk, et al. (2003). "Differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic and hepatic cells." *Methods Enzymol* 365: 287-303.
- Kania, G., P. Blyszczuk, et al. (2004). "Generation of glycogen- and albumin-producing hepatocyte-like cells from embryonic stem cells." *Biol Chem* 385(10): 943-53.
- Kim, B. O., H. Tian, et al. (2005). "Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model." *Circulation* 112(9 Suppl): I96-104.
- Kogler, G., J. Callejas, et al. (1996). "Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues." *J Hematother* 5(2): 105-16.
- Kogler, G., S. Sensken, et al. (2004). "A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential." *J Exp Med* 200(2): 123-35.
- Kogler, G., T. F. Radke, et al. (2005). "Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells." *Exp Hematol* 33(5): 573-83.
- Korbling, M., R. L. Katz, et al. (2002). "Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells." *N Engl J Med* 346(10): 738-46.
- Krause, D. S., N. D. Theise, et al. (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." *Cell* 105(3): 369-77.
- Kruse, C., M. Birth, et al. (2004). "Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas." *Appl. Phys. A* 79: 1617-1624.
- Kucia, M., J. Ratajczak, et al. (2005). "Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous--that is the question." *Exp Hematol* 33(6): 613-23.
- Lagasse, E., H. Connors, et al. (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." *Nat Med* 6(11): 1229-34.
- Lange, C., P. Bassler, et al. (2005). "Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells." *World J Gastroenterol* 11(29): 4497-504.
- Le Blanc, K. and M. Pittenger (2005). "Mesenchymal stem cells: progress toward promise." *Cytotherapy* 7(1): 36-45.

Literatur

Lee, K. D., T. K. Kuo, et al. (2004). "In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells." *Hepatology* 40(6): 1275-84.

Lewis, J. P. and F. E. Trobaugh, Jr. (1964). "Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 204: 589-90.

Li, W. C., M. E. Horb, et al. (2005). "In vitro transdifferentiation of hepatoma cells into functional pancreatic cells." *Mech Dev* 122(6): 835-47.

Libbrecht, L. and T. Roskams (2002). "Hepatic progenitor cells in human liver diseases." *Semin Cell Dev Biol* 13(6): 389-96.

Lumelsky, N., O. Blondel, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." *Science* 292(5520): 1389-94.

Masson, S., D. J. Harrison, et al. (2004). "Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review." *Stem Cells* 22(6): 897-907.

Meuleman, P., L. Libbrecht, et al. (2005). "Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera." *Hepatology* 41(4): 847-56.

Micallef, S. J., M. E. Janes, et al. (2005). "Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells." *Diabetes* 54(2): 301-5.

Miyashita, H., A. Suzuki, et al. (2002). "Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro." *Cell Transplant* 11(5): 429-34.

Miyazaki, S., E. Yamato, et al. (2004). "Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells." *Diabetes* 53(4): 1030-7.

Moriscot, C., F. de Fraipont, et al. (2005). "Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro." *Stem Cells* 23(4): 594-603.

Newsome, P. N., I. Johannessen, et al. (2003). "Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion." *Gastroenterology* 124(7): 1891-900.

Odorico, J. S., D. S. Kaufman, et al. (2001). "Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines." *Stem Cells* 19(3): 193-204.

Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." *Science* 284(5417): 1168-70.

Petropavlovskaja, M. and L. Rosenberg (2002). "Identification and characterization of small cells in the adult pancreas: potential progenitor cells?" *Cell Tissue Res* 310(1): 51-8.

Literatur

- Rajagopal, J., W. J. Anderson, et al. (2003). "Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake." *Science* 299(5605): 363.
- Rambhatla, L., C. P. Chiu, et al. (2003). "Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells." *Cell Transplant* 12(1): 1-11.
- Schuldiner, M., O. Yanuka, et al. (2000). "Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11307-12.
- Schwartz, R. E., M. Reyes, et al. (2002). "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." *J Clin Invest* 109(10): 1291-302.
- Seaberg, R. M., S. R. Smukler, et al. (2004). "Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages." *Nat Biotechnol* 22(9): 1115-24.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, et al. (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13726-31.
- Shen, C. N., M. E. Horb, et al. (2003). "Transdifferentiation of pancreas to liver." *Mech Dev* 120(1): 107-16.
- Shi, Y., L. Hou, et al. (2005). "Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid." *Stem Cells* 23(5): 656-62.
- Sipione, S., A. Eshpeter, et al. (2004). "Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells." *Diabetologia* 47(3): 499-508.
- Soria, B., E. Andreu, et al. (2000). "Engineering pancreatic islets." *Pflugers Arch* 440(1): 1-18.
- Soria, B., E. Roche, et al. (2000). "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice." *Diabetes* 49(2): 157-62.
- Strauer, B. E., M. Brehm, et al. (2005). "Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study." *J Am Coll Cardiol* 46(9): 1651-8.
- Suzuki, A., H. Nakauchi, et al. (2004). "Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting." *Diabetes* 53(8): 2143-52.
- Suzuki, A., Y. W. Zheng Yw, et al. (2002). "Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver." *J Cell Biol* 156(1): 173-84.
- Tabei, I., H. Hashimoto, et al. (2005). "Characteristics of hepatocytes derived from early ES cells and treatment of surgically induced liver failure rats by transplantation." *Transplant Proc* 37(1): 262-4.

Literatur

- Theise, N. D., S. Badve, et al. (2000). "Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation." *Hepatology* 31(1): 235-40.
- Theise, N. D., M. Nimmakayalu, et al. (2000). "Liver from bone marrow in humans." *Hepatology* 32(1): 11-6.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* 282(5391): 1145-7.
- Vassilopoulos, G., P. R. Wang, et al. (2003). "Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion." *Nature* 422(6934): 901-4.
- Verfaillie, C. (2005). "Stem cell plasticity." *Hematology* 10 Suppl 1: 293-6.
- Verfaillie, C. M., R. Schwartz, et al. (2003). "Unexpected potential of adult stem cells." *Ann N Y Acad Sci* 996: 231-4.
- Wagers, A. J., R. I. Sherwood, et al. (2002). "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells." *Science* 297(5590): 2256-9.
- Wang, X., M. Al-Dhalimy, et al. (2001). "Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells." *Am J Pathol* 158(2): 571-9.
- Wang, X., M. Foster, et al. (2003). "The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11881-8.
- Wang, X., H. Willenbring, et al. (2003). "Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes." *Nature* 422(6934): 897-901.
- Yamada, T., M. Yoshikawa, et al. (2002). "In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green." *Stem Cells* 20(2): 146-54.
- Yang, L., S. Li, et al. (2002). "In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 8078-83.
- Yoshida, S., F. Ishikawa, et al. (2005). "Human cord blood--derived cells generate insulin-producing cells in vivo." *Stem Cells* 23(9): 1409-16.
- Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, et al. (1996). "The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis." *Int J Hematol* 63(3): 179-92.
- Zaret, K. S. (2002). "Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis." *Nat Rev Genet* 3(7): 499-512.
- Zulewski, H., E. J. Abraham, et al. (2001). "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes." *Diabetes* 50(3): 521-33.

Bücher

Speckmann & Wittkowski, Bau und Funktion des menschlichen Körpers; 20 Aufl. Urban & Fischer

Konrad Kunsch, Der Mensch in Zahlen, Spektrum Verlag

world wide web

www.kompetenznetz-hepatitis.de

www.diabetes.uni-duesseldorf.de

www.ddz.uni-duesseldorf.de

<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/>

www.eurotransplant.nl

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 19.12.2005

(Sandra Sensken)