

**Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus
zu Hepatozyten –
Etablierung eines *in vitro*-Systems zur Analyse des
Differenzierungsprozesses auf der Basis transgener
Reporterzelllinien**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Markus Möbs

aus Berlin

Dezember 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 09. Dezember 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Georg Pauli (Robert Koch-Institut, Berlin)
und Prof. Dr. Susanne Modrow (Universität Regensburg)

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Jürgen Heinze
1. Gutachter:	Prof. Dr. Susanne Modrow
2. Gutachter:	Prof. Dr. Georg Pauli
3. Prüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Die Durchführung des Großteils der praktischen Arbeiten erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Eberhard Hildt am Robert Koch-Institut in Berlin.

Inhaltsverzeichnis

A	Zusammenfassung	7
B	Abkürzungsverzeichnis.....	9
I	Einleitung	11
I.1	Die Maus als Modellsystem in der Embryonalentwicklung.....	11
I.2	Die Organogenese der Leber	13
I.2.1	Erlangung der Kompetenz des Darmrohrentoderms	15
I.2.2	Spezifizierung der Zellen durch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren	17
I.2.3	Entstehung der Leberknospe	18
I.2.4	Einwanderung der Hepatoblasten ins umliegende Gewebe.....	19
I.2.5	Proliferation der Hepatoblasten und Wachstum der fetalen Leber.....	21
I.2.6	Späte Stadien der Leberentwicklung	24
I.2.6.1	Differenzierung der Hepatoblasten zu Cholangiozyten.....	25
I.2.6.2	Differenzierung der Hepatoblasten zu Hepatozyten und Entstehung der Leberarchitektur	28
I.3	Embryonale Stammzellen der Maus	33
I.4	Differenzierung embryonaler Stammzellen <i>in vitro</i>	37
I.4.1	Die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten <i>in vitro</i>	39
I.5	Zielsetzung der Arbeit	43
II	Material.....	45
II.1	Chemikalien	45
II.2	Restriktionsendonukleasen	45
II.3	Einwegmaterialien für die Zellkultur	45
II.4	DNA-Größenstandards.....	46
II.5	Antikörper	46
II.6	Verwendete Promotor/Enhancer-Konstrukte.....	46
II.7	Primer.....	47
II.8	Plasmide	49
II.8.1	Kommerziell erhältliche Plasmide	49
II.8.2	Nicht kommerziell erhältliche Plasmide.....	51
II.8.3	Im Zuge dieser Arbeit generierte Plasmide	52
II.8.3.1	Plasmide zur transienten Expression in eukaryotischen Zellen.....	52
II.8.3.2	Plasmide zur Generierung rekombinanter Moloney-Maus-Leukämie-Virus- basierter Retroviren	52
II.8.3.3	Plasmide zur stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen durch homologe Rekombination	53
II.9	Bakterienstämme	53
II.10	Zelllinien	54
III	Methoden	55
III.1	Molekularbiologische Methoden	55
III.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	55
III.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA	56
III.1.3	Isolierung chromosomaler DNA aus Zellen	57

III.1.4	Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen.....	57
III.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	57
III.1.6	RNA-Isolierung.....	58
III.1.7	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion	59
III.1.8	Isolierung von polyA-RNA aus Gesamt-RNA.....	60
III.1.9	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurepräparationen ..	60
III.1.10	RT-PCR.....	60
III.1.11	Agarose-Gelelektrophorese	61
III.1.12	Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	62
III.1.13	Auffüllen der 3'-Überhänge von DNA-Fragmenten nach enzymatischer Spaltung	62
III.1.14	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	63
III.1.15	Ligation von DNA-Fragmenten.....	63
III.1.16	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	64
III.1.17	Transformation von <i>E. coli</i>	64
III.1.18	Kolonie-PCR.....	65
III.1.19	DNA-Sequenzierung	65
III.2	Zellbiologische Methoden.....	65
III.2.1	Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Gelatine	65
III.2.2	Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Typ I-Kollagen	66
III.2.3	Kultivierung adhärenter Säugerzellen	66
III.2.3.1	Kultivierung undifferenzierter embryonaler Stammzellen der Maus.....	66
III.2.3.2	Kultivierung von HepG2-, HuH-7-, 293- und BD EcoPack2™-293-Zellen.....	66
III.2.3.3	Kultivierung von NIH3T3 Zellen	67
III.2.4	Kryokonservierung von Zellen.....	67
III.2.5	Alkalische Phosphatase-Färbung von ES-Zellen	67
III.2.6	Produktion rekombinanter Moloney-Maus-Leukämie-Viren.....	68
III.2.7	Polyethylenglykol-Fällung rekombinanter MMLV-Partikel.....	68
III.2.8	Bestimmung des Titers infektiöser MMLV-Partikel.....	68
III.2.9	Transfektion	69
III.2.9.1	Polymer-basierte Transfektion	69
III.2.9.2	Infektion mit rekombinanten MMLV-Partikeln	69
III.2.9.3	Elektroporation von ES-Zellen	69
III.2.10	Selektion stabil transfizierter ES-Zellklone.....	70
III.2.11	Genotypisierung selektionierter Zellklone.....	70
III.2.12	Differenzierung der ES-Zellen zu Hepatozyten.....	72
III.2.12.1	Differenzierung in <i>embryoid bodies</i>	72
III.2.12.2	Differenzierung in <i>Monolayer</i> -Kultur	73
III.2.13	Fixierung von Zellen	73
III.3	Immunologische Methoden.....	73
III.3.1	Immunfluoreszenzfärbung	73
III.3.2	Fluoreszenzmikroskopie	74
III.3.3	Durchflusszytometrie.....	75

IV	Ergebnisse	76
IV.1	Etablierung einer von <i>Feeder</i> -Zellen unabhängigen ES-Zellkultur – Überprüfung unterschiedlicher Chargen fetalen Kälberserums	76
IV.2	Etablierung und Optimierung von Differenzierungsprotokollen	78
IV.2.1	Differenzierung in <i>embryoid bodies</i>	78
IV.2.1.1	Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe der verschiedenen Wachstumsfaktoren	78
IV.2.1.2	Einfluss von FGF-4 auf die Differenzierung zu hepatozellulären Vorläufer	80
IV.2.1.3	Einfluss des Serums auf den Differenzierungsprozess	81
IV.2.1.3.1	Einfluss eines zeitlich begrenzten Serumentzugs auf die Entstehung Albumin-positiver Zellen	81
IV.2.1.3.2	Einfluss des verwendeten Kälberserums auf die Expression entwicklungspezifischer Differenzierungsmarker	82
IV.2.2	Differenzierung in <i>Monolayer</i> -Kultur	84
IV.2.2.1	Einfluss von Retinsäure und <i>leukemia inhibitory factor</i> auf die Entstehung entodermaler Zelltypen in <i>Monolayer</i> -Kultur	84
IV.2.3	Zwischenzusammenfassung 1	85
IV.3	Generierung eines Systems zur Visualisierung, Selektionierung und Isolierung unterschiedlicher Differenzierungsstadien während des Differenzierungsprozesses	86
IV.3.1	Funktionalität der ausgewählten regulatorischen Elemente in der Zellkultur	86
IV.3.2	Herstellung transgener ES-Zellen mittels eines Moloney-Maus-Leukämie-Virus-basierten retroviralen Gentransfers	88
IV.3.2.1	Klonierung der retroviralen Expressionskonstrukte	88
IV.3.2.2	Produktion infektiöser rekombinanter MMLV-Partikel	90
IV.3.2.3	Polyethylenglykol-Präzipitation der Virusüberstände	92
IV.3.2.4	Infektion der ES-Zellen mit den Kontrollviren	93
IV.3.2.5	Infektion der ES-Zellen mit den Reporterviren	94
IV.3.3	Herstellung transgener ES-Zellen durch Transfektion und homologe Rekombination	95
IV.3.3.1	Klonierung der pROSA26-1-Reporterkonstrukte	95
IV.3.3.2	Elektroporation der ES-Zellen mit den pROSA-Reporterkonstrukten	97
IV.3.4	Detektion hepatozellulärer Vorläufer mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie	98
IV.3.5	Reporterexpression in den transgenen ES-Zellen	99
IV.3.6	Zwischenzusammenfassung 2	103
V	Diskussion	104
V.1	Etablierung und Optimierung des Differenzierungsprotokolls	105
V.1.1	Der Zeitpunkt der Zugabe externer Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren beeinflusst die Expression leberspezifischer Markergene und bedarf einer Anpassung an die verwendete Zelllinie	105
V.1.2	Der positive Effekt von FGF-4 auf die Entstehung hepatozytenähnlicher Zellen bei Differenzierung in <i>Monolayer</i> -Kultur lässt sich nicht ohne Weiteres auf EB-basierte Protokolle übertragen	106
V.1.3	Unterschiede im verwendeten Kälberserum beeinflussen den Differenzierungsprozess und reduzieren somit die Aussagekraft erzielter Ergebnisse	107

V.2	Generierung eines Systems zu Visualisierung und Selektionierung hepatischer Vorläuferzellen	110
V.2.1	Funktionalität der ausgewählten regulatorischen Elemente.....	110
V.2.2	Herstellung transgener ES-Zellen mittels MMLV-basiertem retroviralem Gentransfer.....	111
V.2.2.1	Die Transfektion der klonierten Expressionsplasmide in die Verpackungszelllinie führt zu relativ niedrigen Virentitern im Überstand	111
V.2.2.2	Eine Reihe von Faktoren verhindert die effiziente Erzeugung der transgenen Zelllinien durch retroviralen Gentransfer.....	112
V.2.2.3	Die durch retroviralen Gentransfer erzeugten CGR8_pQG6P-DsRed2-ES-Zellen zeigen keine erkennbare Synthese des Fluoreszenzproteins	113
V.2.3	Herstellung transgener ES-Zellen durch homologe Rekombination in den ROSA26-Lokus.....	115
V.2.3.1	Die homologe Rekombination der Reporterkonstrukte in den ROSA26-Lokus verläuft äußerst effizient.....	116
V.2.3.2	Die Integration der Expressionskassetten in den ROSA26-Lokus stellt ein viel versprechendes System zur gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression der Reportergene dar	116
V.3	Ausblick	119
VI	Anhang	122
VI.1	Literaturverzeichnis	122
VI.2	Danksagung.....	153

A Zusammenfassung

Die Entwicklung der Organe höherer Lebewesen ist ein komplexer Vorgang, bei dem es zu zahlreichen Wechselwirkungen zwischen Zellen aus unterschiedlichen Geweben kommt. Die Isolierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) und die Entdeckung, dass diese auch *in vitro* zu verschiedenen reifen somatischen Zelltypen differenzieren können bietet ein neues System, um einen Einblick in die Entstehung unterschiedlicher Zelltypen während der Entwicklung der Säugetiere zu erhalten.

Die Veröffentlichung mehrerer Protokolle, die eine Generierung hepatozytenähnlicher Zellen aus murinen ES-Zellen *in vitro* beschreiben, eröffnet nun die Möglichkeit, auch die Organogenese der Leber in diesem System genauer zu studieren. Neben der Untersuchung des Einflusses externer Faktoren auf den Differenzierungsprozess könnte die Durchführung differentieller Genexpressionsanalysen neue Gene identifizieren, welche für die Entwicklung der Hepatozyten relevant sind. Voraussetzung hierfür sind neben effizienten Differenzierungsprotokollen Methoden, die eine unkomplizierte Analyse des Differenzierungsvorgangs ermöglichen. Zudem bedarf es Verfahren, die eine Isolierung erfolgreich differenzierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Differenzierungsprozesses gestatten. Ziel der Arbeit war es zunächst, ein optimiertes Differenzierungsprotokoll zu etablieren und ein Reportersystem zur Analyse des Differenzierungsvorgangs zu generieren.

Im Zuge dieser Arbeit wurde deshalb ein Differenzierungsprotokoll etabliert, das auf dem im Jahr 2001 von Takashi Hamazaki *et al.* publizierten Protokoll beruht und auf der Generierung dreidimensionaler Aggregate, so genannten *embryoid bodies* (EBs), und anschließender Stimulierung durch externe Faktoren beruht. Im Zuge der Optimierung des Protokolls konnte durch eine Anpassung des Zeitpunktes der Zugabe der einzelnen Faktoren an das spezifische Differenzierungsverhalten der verwendeten Zelllinie eine gesteigerte Expression hepatozytenspezifischer Markergene erzielt werden. Zudem wurde versucht, neue Erkenntnisse über die *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten im Differenzierungsprotokoll zu berücksichtigen. Der von einer anderen Gruppe beschriebene positive Einfluss eines zeitlich begrenzten Serumentzugs auf die Entstehung von Hepatozyten-Vorläufern während der Differenzierung in EBs konnte dabei nicht bestätigt werden. Auch *fibroblast growth factor-4*, der in einem auf der Differenzierung in

Monolayer-Kultur basierendes Protokoll zu einer vermehrten Entstehung hepatozytenähnlicher Zellen führt, zeigte im hier verwendeten System nicht den erhofften Effekt.

Durch den Einsatz unterschiedlicher Serumpräparationen zeigt die Arbeit jedoch, dass nicht nur die An- oder Abwesenheit von im Serum enthaltenen Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf den Differenzierungsprozess hat, sondern bereits geringe Unterschiede in deren Zusammensetzung und Konzentration, wie sie bei verschiedenen Chargen vorliegen, die Differenzierung der Zellen deutlich beeinflusst. Dies verdeutlicht die Probleme bei der Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen und somit die Notwendigkeit definierter Bedingungen, wie sie nur bei einer vollständig serumfreien Kultivierung der Zellen vorliegen.

Da weder reife Hepatozyten noch ihre Vorläuferzellen spezifische Oberflächenmarker besitzen, die eine Isolierung mittels Durchflusszytometrie ohne weiteres ermöglichen, wurde versucht, ein Reportersystem zu schaffen, das eine Identifizierung und Isolierung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Differenzierungsprotokolls ermöglicht. Dafür wurden für verschiedene Fluoreszenzproteine kodierende Sequenzen hinter ein Transthyretin-, ein Albumin- bzw. ein Glukose-6-Phosphatase-Promotor-Konstrukt kloniert. Diese Promotoren werden im Zuge der hepatozytenspezifischen Differenzierung aktiviert. Die Konstrukte sollten stabil in das Genom undifferenzierter ES-Zelllinien integriert werden, um so eine zell- bzw. entwicklungsspezifische Expression der Reportergene während des Differenzierungsprozesses zu ermöglichen. Hierfür wurden zwei Verfahren getestet: Zum einen wurde versucht, die transgenen ES-Zellen mittels retroviralem Gentransfer zu erzeugen. Die generierten Moloney-Maus-Leukämie-Virus-basierten Reporterkonstrukte enthielten zusätzlich die Sequenzen verschiedener Resistenzmarker, die über eine *internal ribosomal entry site* kotranslatiert werden sollten. Die Infektion der ES-Zellen mit den rekombinanten Viren führte jedoch zu keiner funktionalen Zelllinie. Zum anderen wurde versucht, die Reporterkonstrukte über homologe Rekombination gezielt in den während der Embryonalentwicklung ubiquitär exprimierten ROSA26-Lokus zu integrieren. Hierdurch wurden mit hoher Effizienz Zelllinien generiert, welche die Reporterkonstrukte stabil integriert haben. Im Falle des Albumin-Promotor-Konstruktes wurde so eine Zelllinie erzeugt, in der eine differenzierungsspezifische Synthese des *enhanced green fluorescent protein* beobachtet werden kann. Dies zeigt, dass diese Methode grundsätzlich geeignet ist, ein solches Reportersystem zügig zu erzeugen, um so den Differenzierungsverlauf analysieren zu können.

B Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	EB	embryoid body
μ	micro (10 ⁻⁶)	EC-Zellen	embryonale Karzinomzellen
AAT	α-1-Antitrypsin	ECACC	European Collection of Cell Cultures
aFGF	acidic FGF, FGF-1	eCFP	enhanced cyan fluorescent protein
AFP	α-Fetoprotein	ECM	extracellular matrix; extrazelluläre Matrix
ALB	Albumin	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AMV	aviäres Myoblastomvirus	EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
Amp ^R , Amp ^R	Ampizillinresistenzgen	Elf	embryonic liver fodrin, auch spectrin beta 2 (Spnb2)
AP	alkalische Phosphatase	ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	EST	expressed sequence tag
bFGF	basic FGF, FGF-2	ES-Zellen	embryonale Stammzellen
BMP	bone morphogenetic protein	et al.	et alii, und andere
bp	Basenpaare	ETHZ	Endothelzellen
BRL-Zellen	buffalo rat liver cells	EtOH	Ethanol
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin	F	Farad
BW	backward, rückwärts	FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
bzw.	beziehungsweise	FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
c	Zenti (10 ⁻²)	FGF(R)	fibroblast growth factor (receptor)
c/EPB	CAAT enhancer binding protein	Flk-1	fetal liver kinase, auch kinase insert domain protein receptor (Kdr) oder vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2)
cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat	Fox	Forkhead-Box
cDNA	complementary DNA	FW	forward, vorwärts
CHZ	Cholangiozyt	g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
CMV	Cytomegalovirus	G6P, G6Pase	Glukose-6-Phosphatase
Cre	Cre-Rekombinase des Phagen P1	GATA	GATA binding protein
Ctnnb1	Catenin beta 1, β-Catenin	(nuc)GFP	green fluorescent protein (mit vorangeschalteter Kernlokalisationssequenz)
Cy ³	Indocarbocyanin	GSK-3	Glykogensynthasekinase 3
Cy ⁵	Indodicarbocyanin	h	hour, Stunde
Cyp	Cytochrom P450	HB	Hepatoblast
d	day, Tag	Hex	hematopoietically expressed homeobox
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	Hey1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	HGF	hepatocyte growth factor
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	Hlx	H2.o-like homeo box 1 (Drosophila)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	HNF	hepatocyte nuclear factor
DEX	Dexamethason	Hygro ^R	Hygromycinresistenzgen
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	HZ	Hepatozyt
DMSO	Dimethylsulfoxid	ICM	inner cell mass; innere Zellmasse
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure	Id	inhibitor of differentiation
DNase	Desoxyribonuklease	IGF	insulin-like growth factor
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat		
DsRed	Discosoma sp. red fluorescent protein		
dTTP	Desoxythymidintriphosphat		
E(x)	Tag (x) der Embryonalentwicklung		
E. coli	Escherichia coli		

IgG	Immunglobulin G	PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>	PKM	präkardiales Mesoderm
Itgb1	Integrin beta-1, β 1-Integrin	polyA	polyadenyliert
ITS	Mischung aus Insulin, Transferrin und Selenensäure	Pou5f1	POU <i>domain, class 5, transcription factor 1</i> , auch Oct-3/4
Jak	Janus Kinase	Prox-1	<i>homeobox prospero-like protein-1</i>
kb	Kilobasen	Puro ^R	Puromycinresistenzgen
l	Liter	RBS	<i>repressor binding site</i>
lacZ	β -Galaktosidase	RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
LB-Medium	Medium nach Luria Bertani	RNase	Ribonuklease
LIF(R)	<i>leukemia inhibitory factor (receptor)</i>	RS	all-trans-Retinsäure
LK	Leberknospe	RT	Raumtemperatur
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase	RT-PCR	an eine Reverse Transkription gekoppelte PCR
LTR	<i>long terminal repeat</i>	s	Svedberg-Einheit
m	Milli (10^{-3}) bzw. Meter	SDS	Natriumdodecylsulfat
M	Molar (Mol pro Liter)	SE	Serumentzug
MAP(K)	<i>mitogen activated protein (kinase)</i>	sec	Sekunde
MCS	<i>multiple cloning site</i>	SFK	Src-Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase
min	Minute	Sox2	<i>SRY-related high-mobility group-box protein-2</i>
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus	sp.	<i>species</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Viren-Zell-Verhältnis	Stat	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
mRNA	messenger- (Boten-) RNA	STM	Septum Transversum-Mesenchym
MSV	Maus-Sarkom-Virus	SV40	Simian Virus 40
n	Nano (10^{-9}) bzw. Anzahl	T4	Bakteriophage T4
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	TAE	Tris/Acetat/EDTA
NCR	<i>negative control region</i>	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
NCS	<i>newborn calf serum</i> , Serum aus neugeborenen Kälbern	TAT	Tyrosinaminotransferase
NeoR, Neo ^R	Neomycinresistenzgen	TE	Tris/EDTA
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>	TGF	<i>transforming growth factor</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
OD	optische Dichte	TO, Tdo2	Tryptophan-2,3-dioxygenase
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen	Tris	Trihydroxymethylaminomethan
OSM	Oncostatin M	TTR	Transthyretin
Pah	Phenylalanin-Hydroxylase	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphat-gepufferte Salzlösung bzw. <i>primer binding site</i>	ü.N.	über Nacht
PBS-T	Tween-20 in PBS	v/v	Volumen pro Volumen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase- Kettenreaktion	V	Volt
Pdx-1	<i>pancreatic duodenal homeobox-1</i>	VE	ventrales Entoderm
PEG	Polyethylenglykol	w/v	Gewicht pro Volumen
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Karboxykinase	Wnt	Mitglieder der Wnt-Familie der Transkriptionsfaktoren
PGK	Phosphoglyceratkinase	WT	Wildtyp
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Oxoniumionen einer Lösung	Xbp1	<i>X-box binding protein 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	Xlhbox-8	<i>Xenopus</i> -Homolog von Pdx-1
		ZeoR, Zeo ^R	Zeocinresistenzgen

I Einleitung

I.1 Die Maus als Modellsystem in der Embryonalentwicklung

Um die komplexen Vorgänge der menschlichen Entwicklung und der Entstehung von Missbildungen und Krankheiten verstehen und untersuchen zu können, bedarf es aus offensichtlichen ethischen, aber auch praktischen Gründen der Verwendung von Modellorganismen. Während der langen Tradition der Entwicklungsbiologie von Aristoteles bis heute kristallisierte sich dabei eine Reihe von Organismen heraus, die sich in der Forschung als besonders geeignet erwiesen. Die Kriterien, die an einen Modellorganismus gestellt werden, sind dabei stets die gleichen. Zum einen sollte der Organismus nicht zu groß sein, sich leicht züchten lassen und dabei eine hohe Reproduktionsrate und einen kurzen Generationszyklus aufweisen. Zum anderen sollte er für genetische Modifikationen gut zugänglich sein, und eventuell daraus resultierende Effekte während der Entwicklung sollten leicht zu untersuchen sein. Zu den meist verwendeten Organismen gehören hierbei der Nematode *Caenorhabditis elegans*, die Taufliege (*Drosophila melanogaster*), der Zebrafisch (*Danio rerio*), der afrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), das

Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*), die Ratte (*Rattus sp.*) und die Hausmaus (*Mus musculus*).

Die rasante Entwicklung von Methoden zur Manipulation von Mausembryonen in den letzten 30 Jahren führte dabei zu einer immer größeren Bedeutung der Hausmaus als Modell für die Embryonalentwicklung von Säugetieren. So konnte bereits 1974 gezeigt werden, dass sich in die frühe Blastozyste injizierte Teratokarzinom-Zellen an der Entwicklung des Mausembryos beteiligen können und auf diese Weise chimäre Tiere erzeugt werden können (Brinster, 1974). Die Entdeckung, dass die Injektion gereinigter DNA in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle zur stabilen Transformation der Zellen einer neugeborenen Maus führen kann (Gordon et al., 1980), führte alsbald zur Generierung der ersten ein Transgen exprimierenden Maus (Palmiter et al., 1982). Ein weiterer wichtiger Schritt war die Isolierung und Vermehrung pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen; Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) und die Entdeckung, dass sich diese nach Injektion in frühe Embryonen zu allen Zelltypen des adulten Tiers, inklusive Zellen der Keimbahn, entwickeln können (Bradley et al., 1984). Dies ermöglichte die gezielte genetische Manipulation pluripotenter Zellen in Kultur. So gelang es 1986 das erste Mal, durch retroviralen Gentransfer in embryonale Stammzellen und anschließende Injektion der modifizierten Zellen in Maus-Blastozysten chimäre Tiere zu schaffen, welche die exogene DNA stabil in Keimzellen integriert hatten (Robertson et al., 1986). Durch homologe Rekombination war man bald in der Lage, Gene in ES-Zellen gezielt zu manipulieren (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987) und konnte somit deren Auswirkung auf den Entwicklungsprozess untersuchen.

Zwei weitere Entwicklungen trugen dazu bei, diese Möglichkeiten noch zu erweitern. Oft führt die gezielte Zerstörung (*knockout*) eines Gens schon früh in der Embryogenese zum Abbruch der Entwicklung und zum Tod des Embryos. Dies gilt im Besonderen für Gene, die im extraembryonalen Entoderm exprimiert werden und für eine korrekte Gastrulation von Bedeutung sind. Diese Problematik kann umgangen werden, indem durch Fusion der Blastomere im Zwei-Zell-Stadium erzeugte tetraploide Embryonen im späteren Morulastadium mit diploiden ES-Zellen aggregiert werden (Nagy et al., 1990). Hierbei entwickeln sich die diploiden ES-Zellen zu allen Zellen des späteren Fetus, während das extraembryonale Entoderm ausschließlich von den tetraploiden Zellen gebildet wird. Durch Kombination von tetraploiden Wildtypzellen mit mutierten ES-Zellen lässt sich so auch die Bedeutung von Genen für spätere Entwicklungsprozesse untersuchen, welche aufgrund ihrer Funktion im extraembryonalen Entoderm bei einem *knockout*

schon früh zum Abbruch der Embryonalentwicklung führen.

Jedoch ist die Funktion eines Gens auch in den folgenden Entwicklungsstadien meist nicht auf einen einzigen Zeitpunkt beschränkt, wodurch die Untersuchung der Genfunktion oft auf die früheste essentielle Rolle des entsprechenden Genprodukts begrenzt wird. Zudem sind viele Gene nicht nur an der Bildung eines einzelnen Organs oder Gewebes beteiligt. Da während der Embryogenese Wechselwirkungen zwischen den sich entwickelnden Strukturen häufig von großer Bedeutung sind, kann durch das einfache Ausschalten eines Gens oft keine Aussage darüber gemacht werden, ob der beobachtete Effekt nun direkt auf einem Defekt in der differenzierenden Zelle oder aber indirekt auf dem Fehlen eines Stimulus von benachbarten Zellen beruht. Ein großer Fortschritt konnte hierbei durch die Entwicklung des *Cre/loxP*-Systems gemacht werden, das einen zell- und entwicklungspezifischen *knockout* eines Gens ermöglicht (Sternberg and Hamilton, 1981; Orban et al., 1992).

Dies alles und die Vielzahl der existierenden Inzuchtstämme führte vermutlich dazu, dass das Mausgenom nach der Sequenzierung des humanen Genoms (Venter et al., 2001) als zweites Genom eines Wirbeltiers vollständig sequenziert wurde (Waterston et al., 2002). Dabei ergab sich, dass etwa 99 % aller identifizierten Gene der Maus ein homologes Gen im humanen Genom besitzen, von denen wiederum etwa 96 % in einem vergleichbaren Kontext angeordnet sind. 80 % der Gene der Maus haben dabei genau eine Entsprechung im humanen Genom. Der Vergleich der Sequenzen dieser als ortholog bezeichneten Gene zeigte eine mittlere Übereinstimmung von 78,5 % auf Aminosäureebene. Dies zeigt, dass die Maus durchaus als Modellorganismus für die Entwicklung des Menschen geeignet ist, auch wenn sicherlich nicht alle gewonnenen Erkenntnisse unmittelbar übertragbar sind.

I.2 Die Organogenese der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan der Wirbeltiere. Sie ist verantwortlich für die Produktion wichtiger Serumproteine wie Albumin, Gerinnungsfaktoren und Akute-Phase-Proteine und ist maßgeblich an der Speicherung von Glukose und Fetten beteiligt. Sie ist zudem für den Abbau und die Ausscheidung einer Reihe von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen verantwortlich.

Die Leber der Wirbeltiere ist entodermalen Ursprungs und entwickelt sich aus dem ventralen Abschnitt des anterioren Darmrohrs (Douarin, 1975). Die Entwicklung lässt sich dabei in mehrere Schritte einteilen: Der erste Schritt ist die Erlangung der Kompetenz des Darmrohrepithels auf Faktoren zu reagieren, die zu einer Spezifizierung der Zellen führen, entlang der hepatischen Linie zu differenzieren. In weiteren Schritten kommt es zu eben dieser Determinierung des Darmrohrabschnittes sowie der Proliferation und Differenzierung dieser Zellen, welche zum Wachstum des Organs, der Übernahme lebertypischer Funktionen und dem Entstehen der Leberarchitektur führen. Die einzelnen Schritte sind nicht immer klar zu trennen, und viele Faktoren sind an mehreren dieser Prozesse beteiligt (vergleiche Seite 15, Abbildung 1; Seite 18, Abbildung 3; Seite 24, Abbildung 4; und Seite 28, Abbildung 5).

Dabei kommt es zu zahlreichen Wechselwirkungen mit Zellen anderer Gewebe. Eine ganze Reihe von Signalmolekülen wurde bereits identifiziert und die Bedeutung vieler Transkriptionsfaktoren aufgeklärt. Auch Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) spielen dabei eine wichtige Rolle. Während der Entwicklung der Leber kommt es zu deutlichen Änderungen in der Lokalisation von Bestandteilen der ECM und ihren zellulären Rezeptoren (Shiojiri and Sugiyama, 2004). ECM-Komponenten können dabei über spezifische Rezeptoren, die Integrine, direkt die Stimulierung intrazellulärer Signalwege beeinflussen und so Prozesse wie Zellwanderung, Proliferation, Überleben (oder Apoptose) und Differenzierung der fetalen Leberzellen beeinflussen (zusammengefasst in: Pozzi and Zent, 2003; Stupack and Cheresch, 2002; Lee and Juliano, 2004). Auch Mechanismen wie die Bindung und Konzentrierung von Signalmolekülen sowie die Regulation von deren Rezeptorinteraktion, wie sie vor allem für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factors*, FGFs) gut dokumentiert sind, spielen vermutlich eine Rolle (für eine aktuelle Zusammenstellung diesbezüglicher Ergebnisse siehe: Harmer, 2006).

Bei der Maus beginnt die Hepatogenese etwa um Tag 8,5 der Embryonalentwicklung (E8,5) im 7- bis 8-Somiten-Stadium (Gualdi et al., 1996; Cascio und Zaret, 1991). Es kommt zu einer Proliferation entodermaler Zellen und zu einer Verdickung des ventralen Darmrohrabschnittes im 9,5-Somiten-Stadium, woraus in Folge die so genannte Leberknospe entsteht (Abbildungen 1B und 3A).

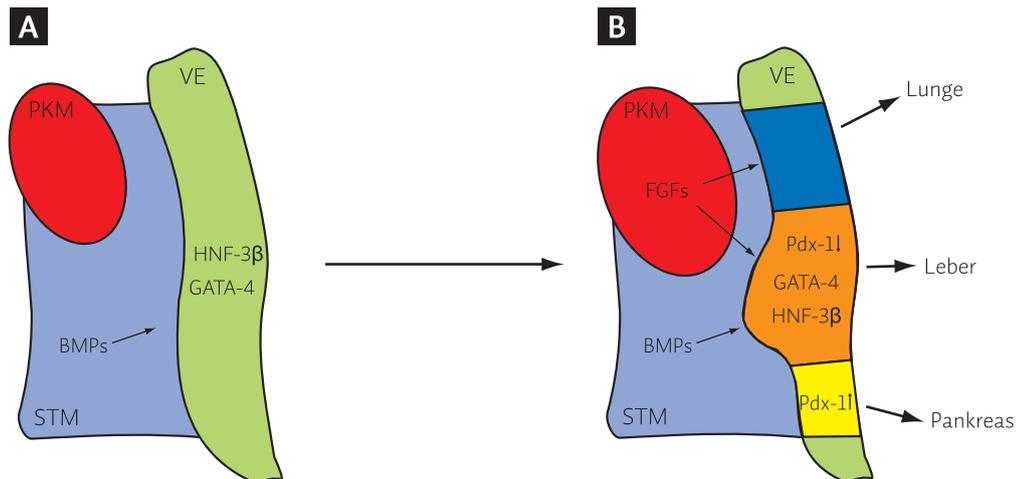


Abbildung 1: Frühe Vorgänge während der Organogenese der Leber. Die frühen Stadien der Leberentwicklung lassen sich in die Erlangung der Kompetenz der Zellen des Darmrohrepithels (A) sowie die Spezifizierung der Zellen, entlang der hepatischen Linie zu differenzieren (B), einteilen. Gezeigt sind die Faktoren und Wechselwirkungen, welche in den beiden Stadien eine Rolle spielen. Weitere Details siehe Text. **PKM:** präkardiales Mesoderm; **STM:** Septum Transversum-Mesenchym; **VE:** ventrales Entoderm.

Bei den Zellen, die an der Bildung der Leberknospe beteiligt sind, handelt es sich dabei um zwei distinkte, lateral und medial gelegene Typen entodermaler Progenitorzellen, die aus drei räumlich getrennten Regionen des frühen Embryos entstehen (Tremblay und Zaret, 2005). Eines der ersten leberspezifischen Gene, das zu diesem Zeitpunkt exprimiert wird, ist das für Albumin kodierende Gen (Cascio und Zaret, 1991; Gualdi et al., 1996).

I.2.1 Erlangung der Kompetenz des Darmrohrentoderms

Schon vor dem Beginn der Hepatogenese der Maus werden im gesamten Entoderm Transkriptionsfaktoren der *hepatocyte nuclear factor* (HNF)-3-Familie exprimiert (Altaba et al., 1993; Ang et al., 1993; Abbildung 1A). Es konnte gezeigt werden, dass HNF-3 (Foxa) dabei an den Albumin-Enhancer bindet, aber nicht ausreichend für eine Expression des Albumingens ist (Gualdi et al., 1996). HNF-3 besitzt wiederum eine unerwartet große Fähigkeit, seine Erkennungssequenz auch in kondensiertem Chromatin zu binden und eine Änderung in der Nukleosomenstruktur hervorzurufen (Cirillo et al., 1998; Shim et al., 1998; Chaya et al., 2001; Cirillo et al., 2002). Die Zerstörung des HNF-3 α -Gens (*Hnf-3 α* bzw. *Foxa1*) oder des HNF-3 γ -Gens (*Hnf-3 γ* bzw. *Foxa3*) hat dabei keine größeren Auswirkungen auf die frühe Embryonalentwicklung (Kaestner et al., 1998; Kaestner et al., 1999; Shih et al., 1999). Ein *knockout* von *Hnf-3 β* (*Foxa2*) führt jedoch unter anderem zu einer gestörten Morphogenese des Darmrohrentoderms und verhindert so eine

EINLEITUNG

Assoziation mit Geweben, die für die spätere Induktion der Leberentwicklung eine entscheidende Rolle spielen (Ang und Rossant, 1994; Dufort et al., 1998; Weinstein et al., 1994). Dies erschwert eine weitere Untersuchung des Einflusses von HNF-3 auf die Erlangung der Kompetenz des Entoderms bezüglich der Induktion der Hepatogenese in *Hnf-3^{-/-}-Knockout*-Mäusen. Differenzierungsexperimente an murinen embryonalen Stammzellen *in vitro* zeigten allerdings, dass die stabile Transfektion von ES-Zellen mit *Hnf-3 β* zu einer erheblich früheren und deutlich stärkeren Expression hepatozytenspezifischer Gene in den differenzierenden ES-Zellen führt (Kanda et al., 2003). Auch war der Anteil Albumin-positiver Zellen nach nur 7 Tagen des Differenzierungsprotokolls in den *Hnf-3 β* -transfizierten ES-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen um ein Vielfaches erhöht.

Der nächste Schritt ist vermutlich die Induktion eines weiteren Transkriptionsfaktors in den Zellen des ventralen Entoderms. Rossi *et al.* konnten zeigen, dass für eine erfolgreiche Induktion der Hepatogenese die Sezernierung von *bone morphogenic proteins* (BMPs), im Speziellen von BMP-4, durch Zellen des umliegenden Septum Transversum-Mesenchyms benötigt wird (Rossi et al., 2001; Abbildung 1A). Dabei kommt es vermutlich unter anderem zu einer verstärkten *Gata*-Expression in Zellen des Darmrohrentoderms. GATA-4 bindet zusammen mit HNF-3 an den Albumin-Enhancer noch nicht spezifizierter Zellen (Bossard und Zaret, 1998) und besitzt dabei ebenfalls die Fähigkeit, innerhalb kondensierter Chromatinbereiche zu binden und zu einer Öffnung der Nukleosomenstruktur beizutragen (Cirillo et al., 2002).

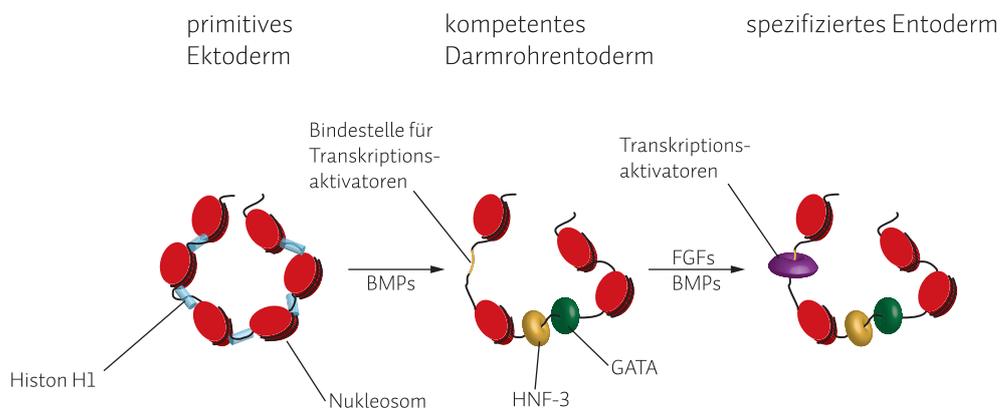


Abbildung 2: HNF-3 und GATA-Faktoren führen zu einer Kompetenz entodermaler Zellen, auf weitere Faktoren zu reagieren. HNF-3 und GATA-Faktoren binden im Bereich regulatorischer Elemente leberspezifischer Gene. Dabei kommt es zu einer Veränderung der Nukleosomenstruktur. Diese ermöglicht das Binden weiterer, für die Spezifizierung der Zellen in Richtung der Hepatogenese benötigter Transkriptionsfaktoren (nach Zhao und Duncan, 2005).

Hierdurch ergibt sich ein Modell, bei dem die gemeinsame Bindung von HNF-3 und GATA-4 an die regulatorischen Elemente leberspezifischer Gene diese für die weiteren Signale kompetent machen, die letztendlich zur Spezifizierung der Zellen in Richtung der Hepatogenese führen (Abbildung 2). Der *knockout* von *Gata-4* führt schon vor der Hepatogenese zu einem Abbruch der Embryonalentwicklung (Molkentin et al., 1997; Kuo et al., 1997). Studien an mittels Tetraploider-Embryo-Komplementation erzeugten *Gata-4*^{-/-}-Embryonen zeigten jedoch, dass es trotz eines Fehlens von GATA-4 zur Bildung einer rudimentären Leberknospe und der Expression des Albumingens kommt (Duncan, 2005). Dies ist jedoch möglicherweise durch eine teilweise Redundanz verschiedener GATA-Faktoren zu erklären.

I.2.2 Spezifizierung der Zellen durch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

Aus Gewebetransplantationsexperimenten wusste man schon früh, dass es Faktoren aus dem präkardialen Mesoderm sind, welche zur Induktion der Hepatogenese im benachbarten ventralen Entoderm führen (Douarin, 1975; Fukuda-Taira, 1981; Gualdi et al., 1996). *In vitro*-Versuche an isoliertem ventralem Entoderm zeigten, dass sowohl FGF-1 (*acidic* FGF, *a*FGF) als auch FGF-2 (*basic* FGF, *b*FGF) die induktiven Eigenschaften des präkardialen Mesoderms ersetzen können und zu einer deutlichen Expression des Albumin- und α -Fetoproteingens in den kultivierten Gewebeisolaten führen (Jung et al., 1999). Dieser Effekt scheint jedoch nicht nur von der Anwesenheit von FGFs abhängig zu sein, sondern auch von deren lokaler Konzentration. Fehlt der Stimulus, beginnen die Zellen *Pdx-1* (*pancreatic duodenal homeobox-1*) zu exprimieren und entwickeln sich entlang einer pankreatischen Linie (Deutsch et al., 2001). Überschreitet die Konzentration einen bestimmten Wert, werden lungenspezifische Gene exprimiert (Serls et al., 2005; Abbildung 1B). FGF-1 und FGF-2 scheinen somit im dem präkardialen Mesoderm benachbarten Abschnitt des ventralen Entoderms zu einer Unterdrückung der *Pdx-1*-Expression und so zu einer Induktion leberspezifischer Gene zu führen. Diese These wird von Transdifferenzierungsexperimenten an *Xenopus* unterstützt. Diese zeigten, dass eine ektopische Expression von *Xlhbbox-8*, dem *Xenopus*-Homolog von *Pdx-1*, unter der Kontrolle des frühen entoderm- bzw. leberspezifischen murinen Transthyretin (TTR)-Promotors zu einer Umwandlung von normalerweise entlang der hepatischen Linie differenzierender Zellen zu pankreatischen Zellen

führt (Horb et al., 2003). Welche Prozesse bei einer höheren FGF-Konzentration dazu führen, dass sich die Zellen in Richtung Lunge anstatt in Richtung Leber entwickeln, ist noch nicht geklärt. Auch FGF-4 hat möglicherweise eine Funktion bei diesem Prozess. Zumindest konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von FGF-4 zum Differenzierungsmedium einen positiven Einfluss auf die Entstehung Albumin-positiver Zellen bei der *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen in *Monolayer*-Kultur hat (Teratani et al., 2005). FGF-8b, das zum Zeitpunkt der Spezifizierung ebenfalls vom präkardialen Mesoderm sezerniert wird, hat zwar keinen Einfluss auf die Spezifizierung, scheint jedoch beim Auswachsen der Leberknospe beteiligt zu sein (Jung et al., 1999).

I.2.3 Entstehung der Leberknospe

Zu diesem Zeitpunkt scheint ein weiterer Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle zu spielen (Abbildung 3A).

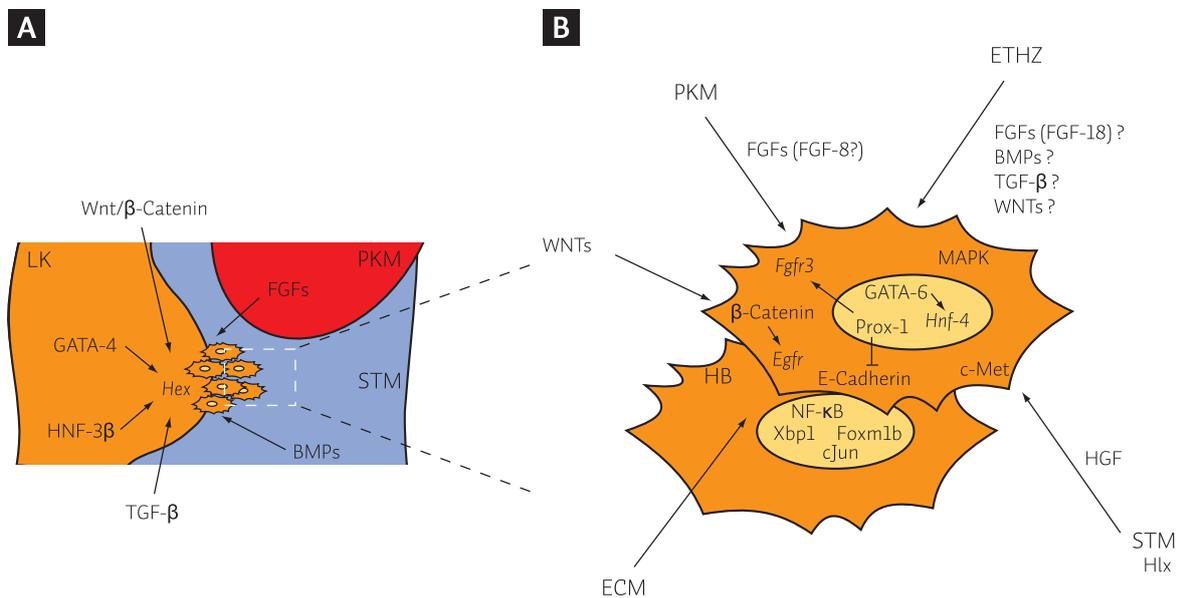


Abbildung 3: Auswachsen der Leberknospe, Einwanderung der Zellen in das Septum Transversum-Mesenchym und Proliferation der Hepatoblasten. Gezeigt sind die Faktoren, die am Auswachsen der Leberknospe (A) sowie an der Einwanderung der Zellen in das Septum Transversum-Mesenchym und der Proliferation der Hepatoblasten beteiligt sind (B). Erläuterungen siehe Text. **ECM:** extrazelluläre Matrix; **ETHZ:** Endothelzellen; **HB:** Hepatoblast; **LK:** Leberknospe; **MAPK:** mitogen activated protein kinase; **PKM:** präkardiales Mesoderm; **STM:** Septum Transversum-Mesenchym.

Hex (*hematopoietically expressed homeobox*) wird bereits vor dem Beginn der Hepatogenese im gesamten ventralen Entoderm exprimiert. Seine Expression beschränkt sich zu Beginn der Hepatogenese allerdings auf zwei spezifische Bereiche, die sich später zur Leber bzw. Schilddrüse entwickeln (Thomas et al., 1998; Keng et al., 1998). In *Hex*^{-/-}-Embryonen kommt es zwar zu einer Verdickung des ventralen Entoderms, jedoch nicht zur Ausbildung einer Leberknospe (Keng et al., 2000; Martinez Barbera et al., 2000; Bort et al., 2004). Dabei scheint die Spezifizierung des Entoderms nicht betroffen zu sein, da sich die Expression leberspezifischer Markergene, z.B. des Albumin- und des Transthyretins, in *Hex*^{-/-}-Embryonen nachweisen lässt. Vielmehr scheint die Expression von *Hex* für einen Übergang von einer für Zellen des Darmrohrepithels typischen zylinderförmigen Morphologie zu einer geschichteten bzw. „pseudo-geschichteten“ Morphologie notwendig zu sein (Bort et al., 2006). Die Induktion der *Hex*-Expression scheint dabei der Kontrolle des Wnt/ β -Catenin- und des *transforming growth factor* (TGF)- β Signaltransduktionswegs zu unterliegen, wie Untersuchungen an *Xenopus*-Embryonen nahe legen (Zorn et al., 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass der *Hex*-Promoter sowohl von HNF-3 β und GATA-4 aktiviert (Denson et al., 2000) als auch durch BMPs über einen SMAD-abhängigen Signalweg reguliert wird (Zhang et al., 2002). Experimente an Hühnerembryonen ergaben zudem, dass sowohl FGF- als auch BMP-Signale für die Expression von *Hex* im ventralen Entoderm benötigt werden (Zhang et al., 2004). Es ist noch wenig bekannt darüber, wie *Hex* seine Effekte auf molekularer Ebene vermittelt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass *Hex* an HNF-1 α (auch *transcription factor 1*, Tcf1) binden und so dessen Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung verstärken kann (Tanaka et al., 2005).

I.2.4 Einwanderung der Hepatoblasten ins umliegende Gewebe

Im Zuge der Bildung der Leberknospe wird die zu diesem Zeitpunkt noch intakte Basallamina nach und nach zerstört. Die nun als Hepatoblasten bezeichneten Zellen lösen sich vom Darmrohr ab und wandern als Stränge in das umliegende Septum Transversum (Medlock und Haar, 1983; Abbildung 3B). Dabei stehen diese in engem Kontakt zu noch primitiven Sinusoid-ähnlichen Strukturen (Sherer, 1975; Medlock und Haar, 1983; Enzan et al., 1997).

EINLEITUNG

Die Transkriptionsfaktoren GATA-6 und Prox-1

Bei diesem Prozess spielen ebenfalls Faktoren der GATA-Familie der Transkriptionsfaktoren eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass *Gata-6*, das zum Zeitpunkt der Spezifizierung ebenfalls im Darmrohrentoderm exprimiert wird, für ein Auswachsen der Leberknospe und eine Differenzierung der Zellen entlang der hepatischen Linie benötigt wird (Zhao et al., 2005). Der zugrunde liegende Mechanismus beruht dabei vermutlich unter anderem auf der Kontrolle der *Hnf-4*-Expression durch GATA-6 (Morrisey et al., 1998). Eine eindeutige Zuordnung einzelner GATA-Faktoren zu den verschiedenen Entwicklungsprozessen ist jedoch schwierig, da im Falle der Zerstörung eines Gens die anderen Faktoren zumindest teilweise dessen Funktionen übernehmen können.

Entscheidend für die Migration der Hepatoblasten in das umliegende Gewebe scheint auch das *homeobox prospero-like protein* (Prox)-1 zu sein. Eine Zerstörung von *Prox-1* führt zu stark verkleinerten Lebern, und es kann keine Einwanderung von Hepatoblasten in das Septum Transversum beobachtet werden. Vielmehr bilden die Zellen Cluster und sind weiterhin von einer intakten Basallamina umgeben. Dies beruht möglicherweise auf einer anhaltend hohen Synthese von E-Cadherin, die in den wandernden Hepatoblasten von Wildtypmäusen normalerweise herabreguliert wird (Sosa-Pineda et al., 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass Prox-1 direkt die Expression des Gens für den *fibroblast growth factor receptor* (FGFR)-3 regulieren kann (Shin et al., 2006). Dieses wird zumindest schwach auch in der Leber von 17 bis 18 Wochen alten humanen Embryonen und in nahezu allen Geweben von 14 Tage alten Rattenembryonen exprimiert und kann auch noch an E18 in der Leber von Ratten nachgewiesen werden (Partanen et al., 1991; Claus und Grothe, 2001). Der Rezeptor reagiert spezifisch auf FGF-2, -4, -8 und -9 (Ornitz et al., 1996). Eine Bedeutung des Transkriptionsfaktors auch für spätere Entwicklungsprozesse ist demnach wahrscheinlich.

Wechselwirkungen mit Endothelzellen

Neben Faktoren aus dem präkardialen Mesoderm und dem umliegenden Septum Transversum-Mesenchym sind auch Wechselwirkungen mit den Endothelzellen der sich zwischen den Strängen entwickelnden Blutgefäße von Bedeutung (Sherer, 1975; Matsumoto et al., 2001). In *fetal liver kinase* (*Flk*)-1^{-/-}-Mäusen (auch *kinase insert domain protein receptor*, Kdr oder *vascular endothelial growth factor receptor-2*, VEGFR-2), denen Endothelzellen fehlen, kommt es zwar zu einer

Spezifizierung des Darmrohrentoderms in Richtung Hepatogenese und zu einer Bildung eines mehrschichtigen Epithels, jedoch ist keine Einwanderung der frühen Hepatoblasten in das umliegende Septum Transversum-Mesenchym zu beobachten (Matsumoto et al., 2001). Auch die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten *in vitro* wird durch die Inhibierung der Bildung endothelialer Zellen gestört (Ogawa et al., 2005). Welche Prozesse oder Signalmoleküle diese Wechselwirkung vermitteln, ist allerdings noch nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Endothelzellen unter anderem Faktoren sezernieren können wie FGFs, BMPs, TGF- β sowie Mitglieder der Wnt-Familie der Transkriptionsfaktoren (WNTs; Reissmann et al., 1996; Shah et al., 1996; Hirschi et al., 1998; Wright et al., 1999; Antoine et al., 2005). FGF-18, welches unter anderem auch in vaskulären und sinusoidalen Endothelzellen der Leber synthetisiert wird, führt dabei zu einer anhaltenden Stimulierung des MAP-Kinase Signaltransduktionswegs und zu einer vermehrten DNA-Synthese in kultivierten primären Hepatozyten (Antoine et al., 2006). Auch die Expression von Notch-Liganden (Lammert et al., 2000) und Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Kollagen oder Laminin (Sage et al., 1981; Reh et al., 1987) könnten dabei, vor allem aber auch bei späteren Differenzierungsprozessen, eine Rolle spielen (siehe unten).

I.2.5 Proliferation der Hepatoblasten und Wachstum der fetalen Leber

Während die Hepatoblasten tiefer in das mesenchymale Gewebe einwandern, teilen sich diese wiederholt. Dabei wächst die Leber alleine zwischen den Entwicklungsstadien E13 und E20 in der Ratte auf das 84-fache an (Vassy et al., 1988).

HGF

Hepatocyte growth factor (HGF), auch bekannt als *scatter factor*, bindet an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-Met (Bottaro et al., 1991; Naldini et al., 1991), wirkt dadurch als starkes Mitogen und beeinflusst die Beweglichkeit epithelialer Zellen (Gherardi und Stoker, 1991; Gherardi et al., 1989; Weidner et al., 1990). *Hgf* wird während der Entwicklung verschiedenster Organe in mesenchymalen, *c-Met* in epithelialen Zellen exprimiert, was nahe legt, dass es sich bei diesem Signalweg um einen generellen Mechanismus handelt, der an der Interaktion zwischen mesenchymalen und epithelialen Zellen während der Organogenese beteiligt ist (Sonnenberg et al ,

EINLEITUNG

1993b; Sonnenberg et al., 1993a). *Hgf* und *c-Met* werden dabei bereits vor dem zwölften Tag der Embryonalentwicklung im Septum Transversum bzw. in den Hepatoblasten der fetalen Leber der Maus exprimiert (Abbildung 3B). *Hgf*^{-/-}-Mäuse sterben zwischen E13 und E14,5 (Schmidt et al., 1995). Sie zeigen dabei eine um 55 % verkleinerte Leber im Vergleich zu Wildtypmäusen, was auf dem Verlust parenchymaler Zellen beruht. Ein Teil der Zellen zeigt Anzeichen für Apoptose. Eine ektopische Expression von *Hgf* in den Hepatoblasten transgener Mäuse hingegen führt zu einem gesteigerten Wachstum (Shiota et al., 1994).

Der TGF- β -Signalweg

Eine Unterbrechung der TGF- β -vermittelten Signaltransduktion in *Smad2*^{+/-}/*Smad3*^{+/-}- oder *Elf*^{-/-}-Mäusen (*embryonic liver fodrin*, auch spectrin beta 2, *Spnb2*) führt zu hypoplastischen Lebern und einer vermehrten Apoptose der Hepatoblasten (Weinstein et al., 2001; Tang et al., 2003). Dies steht zwar im Gegensatz zu Experimenten, die zeigten, dass TGF- β 1 zu einer verringerten Proliferation und gesteigerten Apoptose in kultivierten fetalen Hepatozyten führt (Sanchez et al., 1995; Fabregat et al., 1996), jedoch gibt es eine ganze Reihe von Faktoren der TGF- β -Familie. Möglicherweise bewirken diese zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung unterschiedliche Effekte oder der Effekt ist abhängig von der Aktivierung zusätzlicher Signalwege.

FGFs

Auch FGF-vermittelte Signale sind an diesen Prozessen wieder beteiligt. Vor allem FGF-8 kann in *ex vivo*-Kulturen embryonaler Lebern sowohl zu Änderungen in der Zellmorphologie als auch zu einer Proliferation und einer verringerten Apoptose der Hepatoblasten führen (Sekhon et al., 2004). Der Effekt könnte dabei auf der beobachteten Aktivierung von β -Catenin in den Zellen beruhen (siehe Abbildung 3B und nächster Abschnitt).

EGF und der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg

Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswegs scheinen ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf das Wachstum der Hepatoblasten zu haben. Die Expression von *Cttnb1*, dem Gen für β -Catenin, hat in der Leber der Maus ihren Höhepunkt zwischen E10 und E12 und nimmt anschließend kontinuierlich ab, bis sie nach E16 nicht mehr nachzuweisen ist (Micsenyi et al., 2004).

Eine Inhibierung des Signalwegs in *ex vivo*-Kulturen embryonaler Mauslebern führt zu einem verringerten Wachstum und zu vermehrter Apoptose in den Explantaten (Monga et al., 2003). Die Überexpression von *Ctnnb1* in Hühnerembryonen resultiert in einer um den Faktor 3 vergrößerten Leber, wogegen die Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Wegs zu einer Reduktion der Lebergröße führt (Suksaweang et al., 2004). Auch die leberspezifische Überexpression von *Ctnnb1* in transgenen Mäusen resultiert in einem gesteigerten Wachstum (Tan et al., 2005), während ein *knockout* des Gens in der Leber zu einem um 10% verkleinerten Organ führt (Sekine et al., 2006). Dabei wird der wachstumsstimulierende Effekt vermutlich durch eine Aktivierung des Gens für den *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor (EGFR) hervorgerufen, der in den *Ctnnb1*-überexprimierenden Lebern verstärkt gebildet wurde (Tan et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression des EGFR-Gens durch Wnt3A stimuliert werden kann und eine Inhibierung des Rezeptors den Effekt der *Ctnnb1*-Überexpression in den transgenen Mäusen hemmt. EGF wiederum kann den pro-apoptischen Effekt von TGF- β 1 in kultivierten fetalen Hepatozyten hemmen (Fabregat et al., 1996).

Hlx und andere Transkriptionsfaktoren

1996 zeigten Hentsch und Koautoren, dass die Expression von *Hlx* (*H2.0-like homeo box*) einem für einen Homöobox-Transkriptionsfaktor kodierenden Gen, im Septum Transversum für ein normales Wachstum der Leber benötigt wird (Hentsch et al., 1996). Seine Zielgene sind allerdings nicht bekannt und so kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, welche der proliferationsstimulierenden Signale des mesenchymalen Gewebes davon betroffen sind.

Welche Transkriptionsfaktoren in den Hepatoblasten im Einzelnen für die proliferativen bzw. anti-apoptischen Effekte während der Wachstumsphase der Leber verantwortlich sind, ist nicht immer klar. Gen-*Knockout*-Studien an Mausembryonen konnten eine Beteiligung des *nuclear factor* (NF)- κ B Signalwegs am Schutz der durch *tumor necrosis factor* (TNF)- α vermittelten Apoptose zeigen. Auch ein Einfluss der Proliferationsregulierung durch die Transkriptionsfaktoren Xbp1, Foxm1b und Mechanismen, die durch den AP-1-Transkriptionsfaktor c-Jun vermittelt werden, konnten identifiziert werden (zusammengefasst in: Zhao und Duncan, 2005).

I.2.6 Späte Stadien der Leberentwicklung

Vor dem 12. Tag der Embryonalentwicklung der Nagetiere bleiben die Hepatoblasten in einem morphologisch undifferenzierten Stadium. Sie haben eine ungleichmäßige Form und nur einen geringen Teil der Organellen, wie ihn differenzierte Hepatozyten besitzen (Luzzatto, 1981; Medlock und Haar, 1983). Bei der Ratte verändern sie zwischen Tag 12 und Tag 18 ihr Aussehen von einer eher länglichen zu einer sphärischen Form, um schließlich kurz vor der Geburt an E20 ihre finale polygonale Morphologie zu erhalten (Vassy et al., 1988). Dabei kommt es zu einer Zunahme an rauhem Endoplasmatischem Retikulum und Strukturen des Golgi-Apparates um E12, während die Einlagerung von Glykogen und das Entstehen von Peroxisomen etwa ab dem 18. Tag der Embryonalentwicklung zu beobachten sind (Luzzatto, 1981; Medlock und Haar, 1983). Viele leberspezifische Enzyme werden erst relativ spät während der Entwicklung gebildet, und auch nach der Geburt kommt es noch zu einer Reifung der Hepatozyten und drastischen Veränderungen in deren Expressionsmuster (Burch, 1963; Burch et al., 1963; Greengard, 1969; Greengard et al., 1972; Nemeth, 1954; Panduro et al., 1987). Die Differenzierung zu Cholangiozyten beginnt in der Leber der Maus um den 13. Tag der Embryonalentwicklung und führt bis zum 17. Tag zu individuell unterscheidbaren Gallengängen (Clotman et al., 2002).

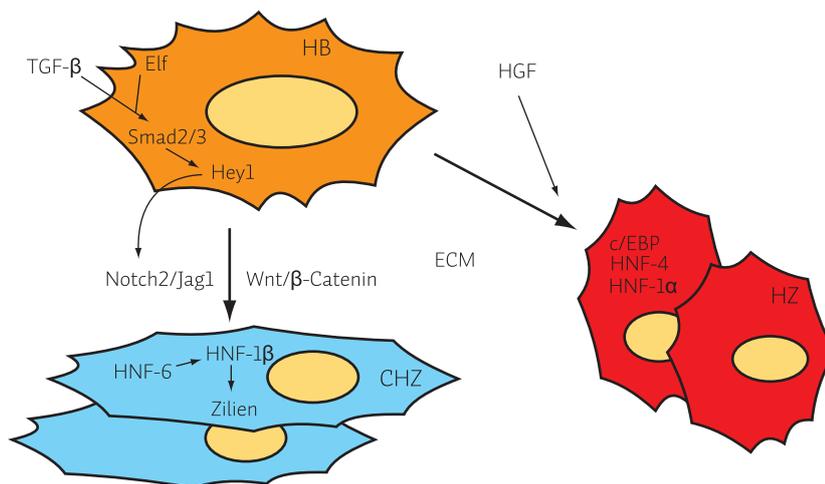


Abbildung 4: Differenzierung der Hepatoblasten zu Cholangiozyten und Hepatozyten. Die Abbildung zeigt bekannte Faktoren und Signalwege, die an der Entscheidung beteiligt sind, ob sich Hepatoblasten zu Hepatozyten oder zu Cholangiozyten entwickeln. Weiter Erläuterungen im Text. **CHZ:** Cholangiozyt; **ECM:** extrazelluläre Matrix; **HB:** Hepatoblast; **HZ:** Hepatozyt.

Welche Vorgänge im Einzelnen dazu führen, ob sich Hepatoblasten nun zu Hepatozyten oder Cholangiozyten entwickeln, ist noch nicht ausreichend geklärt. Allerdings sind inzwischen ver-

schiedene Faktoren bekannt, die dabei eine Rolle spielen (Abbildung 4). Zudem lässt sich oft nicht eindeutig zuordnen, inwieweit ein Faktor nun direkt an dieser Entscheidung beteiligt ist oder lediglich einen Einfluss auf die spätere Ausdifferenzierung der beiden Linien hat, da viele Faktoren in einem komplexen Netzwerk miteinander interagieren und dort mehr als eine Funktion besitzen.

I.2.6.1 Differenzierung der Hepatoblasten zu Cholangiozyten

Der Notch-Signalweg

Wie häufig in der embryonalen Musterbildung spielt das Zusammenspiel zwischen Notch und seinen Liganden eine entscheidende Rolle. Erste Anzeichen hierfür ergaben Studien an einer seltenen Erbkrankheit, dem Alagille-Syndrom. Hierbei kommt es unter anderem zu schweren Entwicklungsstörungen der Leber, welche mit einer stark reduzierten Bildung intrahepatischer Gallengänge einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ursache für diese Krankheit auf Mutationen im humanen *JAG1*-Gen zurückzuführen ist (Oda et al., 1997; Li et al., 1997). Diese Ergebnisse konnten in transgenen Mäusen bestätigt werden, die doppelt heterozygot für ein *Jag1*-Null-Allel und ein hypomorphes *Notch2*-Allel sind und ebenfalls das Fehlen intrahepatischer Gallengänge aufweisen (McCright et al., 2002). Weitere Hinweise für eine Beteiligung von Notch und Jagged1 an der Bildung von Cholangiozyten lieferten Expressionsanalysen von *Jag1* und verschiedenen Rezeptoren der Notch-Familie in Lebern neugeborener Mäuse bzw. in regenerierenden Mauslebern sowie ihrer humanen Homologe in krankhaften, zirrhotischen Lebern (Loomes et al., 2002; Kohler et al., 2004; Nijjar et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass es durch eine konstitutive Aktivierung des Notch2-Signalwegs in isolierten fetalen Hepatoblasten zu einer verstärkten Differenzierung zu cholangiozytenähnlichen Zellen und einer verringerten Expression hepatozytenspezifischer Gene kommt (Tanimizu und Miyajima, 2004). Die Hemmung des Signalwegs durch Notch2-spezifische siRNA wiederum hatte den exakt gegenteiligen Effekt. Die Folge liegt hierbei möglicherweise in der beobachteten Hochregulierung von HNF-1 β (auch *transcription factor 2*, Tcf2 oder *variant HNF-1*, vHNF-1) bzw. der Hemmung der *Hnf-1 α* , *Hnf-4* und *c/EBP α* (CAAT *enhancer binding protein alpha*)-Expression durch eine Aktivierung des Notch-Signalwegs. Genexpressionsanalysen zeigten ebenfalls, dass es nach Stimulierung der bipotenten fetalen Leberzelllinie HBC-3 zur Differenzierung in Gallenepithelzellen zu einer Aktivierung des Notch-Signalwegs kommt (Ader et al., 2006).

EINLEITUNG

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Auch Faktoren, die auf den Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg einwirken, scheinen an der Entscheidung beteiligt zu sein, in welche Richtung die Hepatoblasten differenzieren. So konnte gezeigt werden, dass Wnt3A in *ex vivo*-Kulturen fetaler Lebern zu einer vermehrten Bildung von Cholangiozyten führte, während eine Reduzierung der Aktivität in einer verminderten Expression cholangiozytenspezifischer Marker resultierte (Hussain et al., 2004; Monga et al., 2003). Der leberspezifische *knockout* von *Ctnnb1* in Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Albumin-Promotors exprimieren, zeigte allerdings keine Auffälligkeiten in der Leberarchitektur (Sekine et al., 2006). Jedoch ist das vermutlich auf eine zu geringe Synthese der Cre-Rekombinase in frühen Entwicklungsstadien zurückzuführen, welche nicht für einen vollständigen *knockout* des Gens in den Hepatoblasten ausreicht.

Der TGF- β -Signalweg

Die Rolle des TGF- β -Signalwegs ist sehr kompliziert. Eine Bestätigung für die Beteiligung von Mitgliedern der TGF- β -Familie an der Ausdifferenzierung der Hepatoblasten zu Cholangiozyten bringen Ergebnisse an der bipotenten fetalen Hepatozytenzelllinie HBC-3. Diese zeigt nach Induktion der Differenzierung zu Cholangiozyten neben der Aktivierung des Notch-Signalwegs (siehe oben) zusätzlich eine verstärkte Expression von Genen, die an der Signaltransduktion durch Mitglieder der TGF- β /BMP-Familie beteiligt sind (Ader et al., 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung verschiedener durch TGF- β bzw. BMPs regulierter Gene kommt. Darunter befand sich unter anderem *Hey1* (*hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1*) ein Regulator des Notch-Signalwegs. TGF- β ist dabei möglicherweise für die Kompetenz der Zellen verantwortlich, die Cholangiozytenlinie einzuschlagen. In einer durch die Synthese einer konstitutiv aktiven Form von c-Met immortalisierten fetalen Leberzelllinie der Maus, die sowohl zur Differenzierung zu reifen Hepatozyten als auch zu Cholangiozyten fähig ist, führt TGF- β zur Stabilisierung eines fibroblastenartigen, bipotenten Phänotyps und zu einer Dedifferenzierung epithelialer Zellen, die mit einer reduzierten *Hnf-4*- und *Hnf-1 α* -Expression einhergeht (Spagnoli et al., 2000).

Untersuchungen an kultivierten fetalen Leber-Explantaten zeigten bei einer Unterbrechung des TGF- β -Signalwegs in transgenen Mäusen bzw. durch Inhibierung der Elf-Synthese mittels

antisense-RNAs eine Reduktion der intrahepatischen Gallengänge und eine gestörte Expression von Zytokeratin-Genen, die nicht länger auf die Gallenkanäle beschränkt war (Weinstein et al., 2001; Mishra et al., 1999).

ECM

Auch Komponenten der ECM sind an der Differenzierung der Hepatoblasten zu Cholangiozyten beteiligt. So führt die Kultivierung verschiedener bipotenter embryonaler Leberzelllinien der Maus in Matrigel, einer löslichen Präparation der Basalmembran, welche unter anderem Laminin, Kollagen Typ IV und Heparansulfat enthält, zu einer Induktion verschiedener cholangiozyten-spezifischer Marker und der Bildung tubulärer Strukturen (Rogler, 1997; Spagnoli et al., 1998; Strick-Marchand und Weiss, 2002).

Die Transkriptionsfaktoren HNF-1 β und HNF-6

HNF-1 β spielt eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung der Cholangiozyten bzw. der Morphogenese der Gallengänge. Ein leberspezifischer *knockout* von *Hnf-1 β* führt in Mäusen zu einem fast vollständigen Fehlen kleiner intrahepatischer Gallengänge und zu starken Missbildungen der vorhandenen Strukturen (Coffinier et al., 2002). Möglicherweise beruht der Defekt dabei auf der gestörten Bildung von Zilien, einer Organelle, die eine große Rolle bei der Proliferation tubulärer Zellen spielt. Zumindest in der Niere wird HNF-1 β nämlich für die Expression mehrerer zilienassoziierter Gene benötigt (Gresh et al., 2004; Hiesberger et al., 2004). Ein vergleichbarer Phänotyp entsteht auch bei *Hnf-6*^{-/-}-Mäusen (Clotman et al., 2002; auch *one cut domain family member 1*, *Onecut1*). Hier fehlt jedoch zusätzlich die gesamte Gallenblase. Der Defekt beruht unter anderem vermutlich auf der verminderten *Hnf-1 β* -Expression in den Lebern dieser Mäuse, dessen Promotor durch HNF-6 stimuliert werden kann.

I.2.6.2 Differenzierung der Hepatoblasten zu Hepatozyten und Entstehung der Leberarchitektur

Der TGF- β -Signalweg

Neben den Einflüssen auf die Entstehung von Cholangiozyten scheint TGF- β auch die Reifung der Hepatozyten und die Entstehung der korrekten Leberarchitektur zu beeinflussen (Abbildung 5).

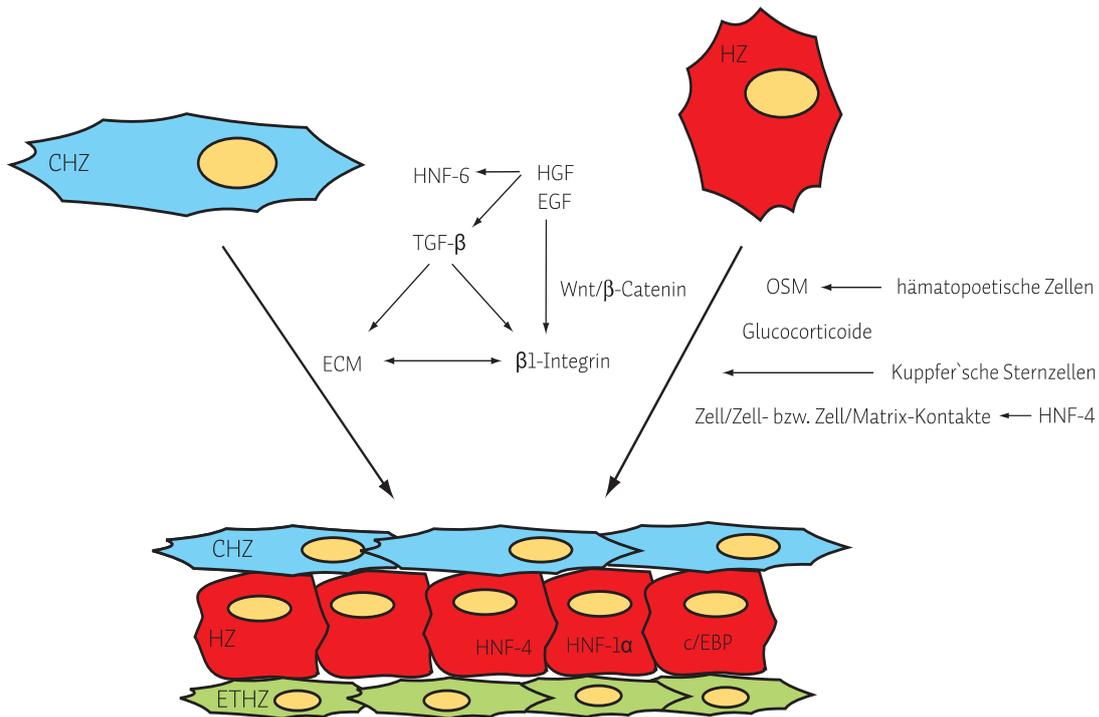


Abbildung 5: Reifung der Hepatozyten und Entstehung der Leberarchitektur. Während der Reifung der Hepatozyten und der Entstehung der späteren Leberarchitektur kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Erläuterungen siehe Text. **CHZ:** Cholangiozyt; **ETHZ:** Endothelzelle; **HZ:** Hepatozyt; **OSM:** Oncostatin M.

In *Smad2*^{+/-}/*Smad3*^{+/-} bzw. *Elf*^{-/-}-Mäusen führt die Unterbrechung des TGF- β -Signalweg zu einer Vergrößerung sinusoidaler Zwischenräume, und die Hepatoblasten sind in kleinen Clustern angeordnet, anstatt geordnete Stränge zu bilden (Weinstein et al., 2001; Tang et al., 2003). Auch kommt es in kultivierten Leber-Explantanten in Folge einer Unterbrechung des TGF- β -Signalwegs zu einer fehlenden morphologischen Reifung der Hepatozyten (Weinstein et al., 2001; Mishra et al., 1999). Inwieweit hierbei allerdings Wechselwirkungen mit der gestörten Cholangiozytenbildung bestehen (siehe oben), wäre noch zu klären. Die Ursache für die Defekte bei den *Smad2*^{+/-}/*Smad3*^{+/-}-transgenen Leber-Explantaten konnte dabei mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine um 90 % reduzierte Expression des β 1-Integrin-Gens und eine abnormale Prozessierung und

Lokalisierung von E-Cadherin zurückgeführt werden. Interessanterweise konnte eine Zugabe von HGF, welches zur Induktion der Expression des Integrin-Gens in Hepatozyten fähig ist (Kawakami-Kimura et al., 1997), den Phänotyp vollständig retten. Auch führt TGF- β zu einer gesteigerten Expression des Fibronectin-Gens in kultivierten fetalen Hepatozyten, welche mit einer ebenfalls erhöhten Expression hepatozytenspezifischer Gene, z.B. der Gene für Albumin und α -Fetoprotein, einhergeht (Sanchez et al., 1995). Die Bedeutung von β 1-Integrin für die Entwicklung der Leber wird zusätzlich durch *Knockout*-Experimente deutlich, die zeigen, dass *Itgb1*^{-/-}-ES-Zellen nicht in der Lage sind, die Leber chimärer Mäuse zu bevölkern (Fassler und Meyer, 1995). Alle anderen Organe (mit Ausnahme der Milz) zeigten die Anwesenheit *Itgb1*^{-/-}-Zellen.

HGF, EGF und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Neben seinem Einfluss auf die Proliferation der Hepatoblasten spielt HGF auch eine entscheidende Rolle bei späten Differenzierungsprozessen und der Entstehung der Leberarchitektur. So führt ein Fehlen von HGF während der Entwicklung nicht nur zu einer verkleinerten Leber, sondern auch zu einem Verlust der Integrität des Leberparenchyms (Schmidt et al., 1995). In Verbindung mit EGF unterstützt es die Bildung einer lebertypischen Architektur in gemischten Kulturen aus Hepatozyten und nicht parenchymalen Zellen (Michalopoulos et al., 1999; Michalopoulos et al., 2001). HGF und EGF induzieren dabei die Expression von *Hnf-6* sowie aller Mitglieder der TGF- β -Familie (Michalopoulos et al., 2003; Abbildung 5). Da die Expression des EGF-Rezeptor-Gens in Hepatoblasten möglicherweise über einen Wnt/ β -Catenin-abhängigen Signalweg reguliert wird (Tan et al., 2005), passt diese Beobachtung auch hervorragend zu den Ergebnissen über die Funktion des Signalwegs bei der Weichenstellung zwischen Cholangiozyten und Hepatozyten (siehe oben). Der durch die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Albumin-Promotors erzielte leberspezifische *knockout* von *Ctnnb1* führte trotz des mangelnden Einflusses auf die Architektur der Leber zu einer fehlenden Expression hepatozytenspezifischer Gene (Sekine et al., 2006).

HGF scheint somit ebenfalls ein Regulator der Bipotenz der Hepatoblasten zu sein. HGF führt zu einer Steigerung der *c/EBP*-Expression in isolierten fetalen Hepatozyten-Vorläufern (Suzuki et al., 2003), also dem gegenteiligen Effekt, den die Aktivierung des Notch-Signalwegs bei der Differenzierung zu Cholangiozyten bewirkt (Tanimizu und Miyajima, 2004; Shiojiri et al., 2004) und fördert so eine Ausdifferenzierung der Hepatoblasten zu reifen Hepatozyten (Abbildungen 4 und 5).

Glukokortikoide

Auch Glukokortikoide haben, neben ihrer Funktion in der Regulation der Expression verschiedener, vor allem am Glukose- und Fettstoffwechsel in der Leber beteiligter Enzyme, einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung und die Entstehung der Leberarchitektur. So konnte gezeigt werden, dass Dexamethason (DEX), ein synthetisches, nicht metabolisierbares Kortikosteroid, die Differenzierung fetaler Rattenhepatozyten *in vitro* stimulieren kann (Chou, 1988). Die Kompetenz, auf Dexamethason zu reagieren, ist abhängig vom Zeitpunkt der Isolierung der Zellen und tritt bei der Ratte erst nach dem 13. Tag der Embryonalentwicklung auf (Shelly et al., 1989). Zudem unterstützt es die durch HGF und EGF induzierte Bildung der lebertypischen Architektur in gemischten Kulturen aus Hepatozyten und nicht-parenchymalen Zellen (Michalopoulos et al., 2001). Dexamethason wird dabei für die Bildung reifer, histologisch erkennbarer Hepatozyten benötigt, die sich eindeutig von den Gallenepithelzellen unterscheiden lassen. Dexamethason führt zu einer Induktion der *c/EBP α* -, *Hnf-4*- und *Hnf-6*-Expression in der Kultur, alles Faktoren, die bei der Differenzierung zu reifen Hepatozyten bzw. Cholangiozyten eine Rolle spielen (Michalopoulos et al., 2003). Auch die Infizierbarkeit einer humanen Hepatomzelllinie durch Hepatitis B-Viren ist von einer Kultivierung mit Glukokortikoiden abhängig (Gripon et al., 2002). Erstaunlicherweise ist es zudem möglich, pankreatische Zellen durch Dexamethason zu einer Transdifferenzierung zu hepatozytenähnlichen Zellen zu stimulieren (Tosh et al., 2002b; Tosh et al., 2002a; Shen et al., 2003; Wang et al., 2005; Burke et al., 2006). Auch hier ist der Effekt vermutlich auf eine Induktion der *c/EBP*- und *Hnf-4*-Expression zurückzuführen.

Der Einfluss hämatopoetischer Zellen

Zwischen dem 28- und dem 30-Somitenstadium (ca. E12) kommt es bei der Maus zu einer Einwanderung hämatopoetischer Zellen in die sich entwickelnde Leber, welche ab diesem Zeitpunkt zum Hauptort der fetalen Hämatopoese wird (Houssaint, 1981). Versuche an Kulturen fetaler muriner Leberzellen *in vitro* zeigten, dass Oncostatin M (OSM), welches in der fetalen Leber von hämatopoetischen Zellen sekretiert wird, für die Expression später Hepatozytenmarker und die Speicherung von Glykogen essentiell ist (Kamiya et al., 1999). OSM scheint dabei für die Kompetenz der Zellen benötigt zu werden, auf Glukokortikoide zu reagieren (siehe oben). Bestätigt wurde die Rolle von OSM *in vivo* durch Versuche, die zeigten, dass Hepatozyten von *gp130^{-/-}*-Mäusen,

denen die signalweiterleitende Komponente des OSM-Rezeptors fehlt, ebenfalls Defekte in der Glykogenspeicherung zeigen. Ebenso scheinen direkte Wechselwirkungen mit den an der Innenwand der Leberkapillaren lokalisierten Kupffer'schen Sternzellen einen Einfluss auf den Differenzierungsprozess hepatischer Vorläuferzellen zu besitzen (Miura et al., 2003).

Die Rolle der Extrazellulären Matrix

Komponenten der ECM haben einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie, Organisation und die Genexpression kultivierter Hepatozyten (Ben-Ze'ev et al., 1988; Caron, 1990; DiPersio et al., 1991; Sanchez et al., 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei H2.35-Zellen dieser Einfluss durch eine Inhibierung der α 3-Integrin-Synthese unterdrückt werden kann (Lora et al., 1998). Die Reifung in geringer Dichte kultivierter fetaler Leberzellen durch OSM führt ebenfalls nur in Verbindung mit der Anwesenheit von ECM-Bestandteilen zur Expression von späten Lebermarkern wie z.B. dem Gen für die Tryptophan-2,3-dioxygenase (*Tdo2*, TO; Kamiya et al., 2002), und eine Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Typ I-Kollagen scheint für die Differenzierung muriner ES-Zellen zu Hepatozyten *in vitro* eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen (Hamazaki et al., 2001).

c/EBP

Eine Inhibierung der c/EBP-Aktivität durch Transfektion eines mutierten, dominant-negativ wirkenden c/EPB-Gens resultiert in kultivierten fetalen Hepatoblasten in einer Unfähigkeit der Zellen, nach Stimulation zu reifen Hepatozyten zu differenzieren und führt zu einer – relativ gesehen – höheren Expression cholangiozytenspezifischer Marker in der Kultur (Suzuki et al., 2003). Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Proliferation von Zellen und einer Redifferenzierung Albumin-positiver Zellen, zu Zellen, die keine *Alb*-Expression mehr zeigten. Die Rolle von c/EBP für die Funktion der Hepatozyten konnte auch schon zuvor gezeigt werden. So können *c/EBP α ^{-/-}*-Mäuse in ihren Lebern kein Glykogen speichern und der Fettstoffwechsel ist gestört (Wang et al., 1995). Zusätzlich kommt es zu einer veränderten Leberarchitektur und einer Störung der Wachstumskontrolle der Hepatozyten nach der Geburt (Flodby et al., 1996; Timchenko et al., 1997).

Die Transkriptionsfaktoren der HNF-Familie

HNF-4 scheint eine ganz entscheidende Rolle bei der Differenzierung der Hepatozyten und der Entstehung einer korrekten Leberarchitektur zu spielen. In einer dedifferenzierten Ratten-Hepatomzelllinie führt die ektopische Expression von *Hnf-4* zu einer Wiederkehr der Expression mehrerer hepatozytenspezifischer Gene (Spath und Weiss, 1997). In Embryonen, die kein HNF-4 α synthetisieren können, sind zwar die Spezifizierung und frühe Entwicklungsprozesse der Leber scheinbar unbeeinträchtigt, jedoch wird eine Reihe von Genen, welche für die Funktion der Hepatozyten essentiell sind, in den E14-Lebern nicht exprimiert (Li et al., 2000). Erstaunlicherweise bindet HNF-4 α an die regulatorischen Elemente von nahezu 50 % aller getesteten, in Hepatozyten exprimierten Gene (Odom et al., 2004). Ein leberspezifischer *knockout* des Gens führt ebenfalls zum Verlust der Expression eines Großteils hepatozytenspezifischer Gene und zudem zu einer verkleinerten Leber in der späteren Embryonalentwicklung (Hayhurst et al., 2001; Parviz et al., 2003). Des Weiteren waren die Hepatozyten nicht wie normalerweise in Epithelien organisiert. Es konnte gezeigt werden, dass HNF-4 α in der Leber die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert, die an der Bildung von Zell/Zell-Kontakten und Zell/Matrix-Kontakten wie *tight junctions*, Desmosomen und Fokalkontakten beteiligt sind und so vermutlich für die Entstehung einer epithelialen Organisation der Hepatozyten eine entscheidende Rolle spielt (Battle et al., 2006). Unterstützt wird diese These durch Experimente an einer Fibroblasten- und einer embryonalen Karzinomzelllinie, welche durch eine erzwungene Expression von *Hnf-4 α* zum Übergang von einer mesenchymalen zu einer epithelialen Morphologie gebracht werden können (Parviz et al., 2003; Chiba et al., 2003). Auch hierbei kommt es zu einer Induktion von Genen, die an der Bildung von Zell/Zell-Kontakten beteiligt sind. Zudem ist HNF-4 α in der Lage, die Expression von *Hnf-1 α* zu stimulieren (Kuo et al., 1992).

HNF-1 α bindet an die regulatorischen Elemente einer Vielzahl leberspezifischer Gene und ist oft von bedeutender Funktion für deren Expression und Zellspezifität (Courtois et al., 1987; Hardon et al., 1988; Vaulont et al., 1989; Tronche et al., 1989; Lichtsteiner und Schibler, 1989; Tsutsumi et al., 1989). *Hnf-1 α ^{-/-}*-Mäuse zeigen eine vergrößerte Leber (Pontoglio et al., 1996). In diesen Mäusen ist eine veränderte Expression leberspezifischer Gene zu beobachten. So ist zum Beispiel die Expression der Gene für Albumin sowie für α -1-Antitrypsin reduziert und die Transkription von *Pab*, das für eine Phenylalanin-Hydrolase kodiert, unterbrochen. HNF-1 α scheint für eine Demethylierung und

einen Umbau der Chromatinstruktur im Bereich des *Pab*-Promotors benötigt zu werden (Pontoglio et al., 1997). HNF-3 β und HNF-3 γ scheinen keinen entscheidenden Einfluss auf die späten Differenzierungsprozesse zu haben. Sie sind beide aber ebenfalls an der Expressionsregulierung verschiedener leberspezifischer Gene beteiligt (Kaestner et al., 1998; Rausa et al., 2000).

Dies zeigt, dass die Entwicklung von Organen ein komplexer Vorgang ist, bei dem Signale und Interaktionen zwischen einer Reihe von unterschiedlichen Zellen und Geweben notwendig sind, die wiederum zur Expression einer ganzen Kaskade verschiedener Transkriptionsfaktoren führen. Durch die Komplexität der Vorgänge werden Untersuchungen erschwert, die weitere Einsichten in die einzelnen Vorgänge während der Differenzierung der Zellen ermöglichen könnten. In den letzten Jahren entwickelte sich dabei ein neuer Untersuchungsansatz, der sich die Fähigkeit von ES-Zellen zu Nutze macht, *in vitro* in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Die *in vitro*-Kultur von ES-Zellen bietet ein leicht zugängliches System, an dem der Einfluss verschiedenster externer Faktoren und genetischer Modifikationen mit einem relativ geringen experimentellen Aufwand durchgeführt werden kann und das auf den Einsatz von Tierexperimenten verzichtet.

I.3 Embryonale Stammzellen der Maus

Die Gewinnung pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus gelang erstmals 1981 durch Isolierung aus der inneren Zellmasse (ICM) sich entwickelnder Blastozysten (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Um die Zellen in ihrem undifferenzierten Zustand zu halten erfolgte die Kultivierung ursprünglich auf mitotisch inaktivierten Fibroblasten, so genannten *feeder cells* oder Ammenzellen, in serumhaltigem Medium. Die Notwendigkeit der Ammenzellen konnte alsbald durch die Verwendung von durch BRL-Zellen (*buffalo rat liver cells*) konditioniertem Medium umgangen werden (Smith und Hooper, 1987). Der dabei für die Erhaltung der Pluripotenz verantwortliche Faktor wurde als *leukemia inhibitory factor* (LIF) identifiziert, einem Mitglied der Interleukin-6-Familie. Dieser ermöglicht nun eine standardmäßige Kultivierung muriner ES-Zellen ohne Ammenzellen (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988; Pease und Williams, 1990).

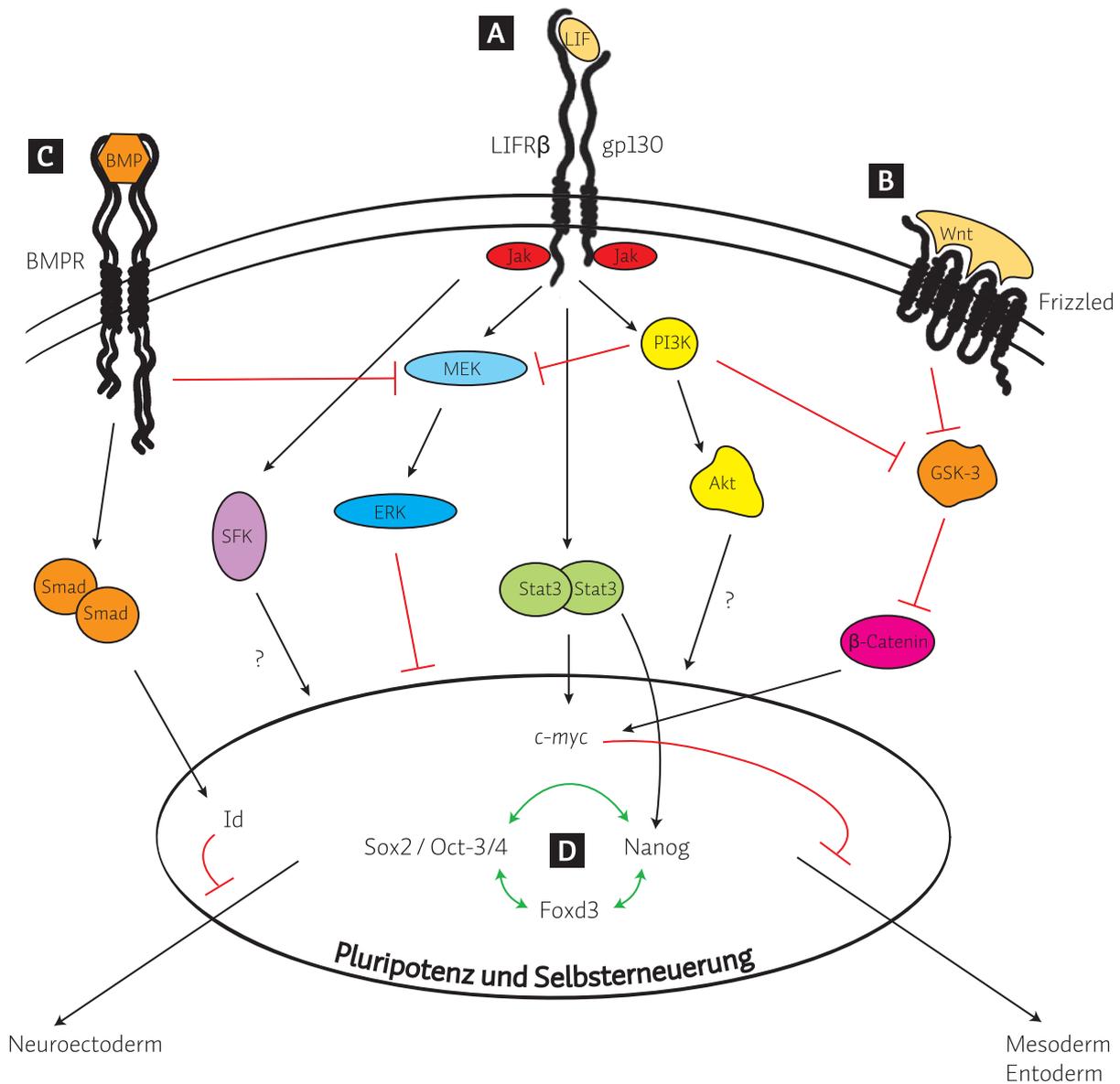


Abbildung 6: Pluripotenz und Selbsterneuerung in murinen ES-Zellen. Verschiedene Signalwege spielen bei der Selbsterneuerung pluripotenter ES-Zellen der Maus eine Rolle. Dabei kommt es zu zahlreichen Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der einzelnen Wege, die schließlich ein fein reguliertes Netzwerk bilden. Erläuterungen siehe Text.

Dabei kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Signalwege (Abbildung 6A). Die Bindung von LIF an seinen Rezeptor (LIFRβ) führt zu dessen Dimerisierung mit gp130 und so zur Aktivierung, Dimerisierung und Kernlokalisierung von *signal transducers and activators of transcription* (Stat3) (Zhang et al., 1997; Niwa et al., 1998; Matsuda et al., 1999). Die Aktivierung von Stat3 ist dabei ausreichend für eine LIF-unabhängige Kultivierung der ES-Zellen in ihrem undifferenzierten Zustand (Matsuda et al., 1999). Der Effekt von Stat3 beruht vermutlich auf der

Induktion der Expression von *c-myc* (Cartwright et al., 2005). Auch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) wird durch die Rezeptordimerisierung aktiviert (Paling et al., 2004). Eine Inhibierung von PI3K führt zu einer verminderten Fähigkeit der ES-Zellen zur Selbsterneuerung, welche mit einer Phosphorylierung von Akt (auch Proteinkinase B, PKB) und Glykogensynthasekinase (GSK)-3 sowie einer erhöhten Aktivierung von *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK) einhergeht. Eine Stimulierung des *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Signalwegs hat einen differenzierungsinduzierenden Effekt (Cheng et al., 1998; Burdon et al., 1999). Verdeutlicht werden konnte die Rolle der PI3K zudem durch Versuche, die zeigten, dass eine konstitutiv aktive Form von Akt die Pluripotenz kultivierter ES-Zellen auch in der Abwesenheit von LIF erhalten kann (Watanabe et al., 2006).

Inwieweit die ebenfalls beobachtete Stimulierung des MAP-Kinase-Signalwegs durch LIF (Matsuda et al., 1999) in dieses Konzept passt, ist noch zu klären. Vermutlich beruht die Erhaltung der Pluripotenz auf einem sensiblen Gleichgewicht der verschiedenen Signalwege. Die Zellen bleiben somit in der Lage, auf feine Unterschiede in deren Aktivität zu reagieren und in den Differenzierungsprozess einzutreten.

Auch Mitglieder der Src-Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (SFK) werden durch LIF und gp130 reguliert und sind für die Selbsterneuerung oder Differenzierung von ES-Zellen wichtig (Ernst et al., 1994; Ernst et al., 1996; Anneren et al., 2004; Meyn, III et al., 2005).

LIF bzw. die Aktivierung von Stat3 ist jedoch nicht in der Lage, die Pluripotenz humaner ES-Zellen zu erhalten (Thomson et al., 1998; Humphrey et al., 2004). Neuere Entdeckungen lassen vermuten, dass bei Säugetieren der Wnt/ β -Catenin-Signalweg hauptsächlich für die Selbsterneuerung pluripotenter Zellen des frühen Embryos – und damit auch isolierter ES-Zellen – verantwortlich ist (Abbildung 6B) und die über LIF vermittelten Signale nur eine Adaptation der Mauszellen sind, welche die Pluripotenz während der Diapause erhalten (Nichols et al., 2001; Sato et al., 2004; Feng et al., 2004).

Versucht man murine ES-Zellen ohne *Feeder*-Zellen bei geringer Dichte unter serumfreien Bedingungen zu kultivieren – z.B. bei der klonalen Expansion einzelner Zellen – differenzieren diese zu neuronalen Zellen. Diese Serumabhängigkeit kann durch Zugabe von BMPs zum Medium ersetzt werden (Ying et al., 2003). BMPs führen dabei zu einer Induktion der Synthese von Id-Proteinen (*inhibitor of differentiation*), die offensichtlich eine Differenzierung zu neuronalen Zellen

verhindern (Ying et al., 2003) und in LIF-freiem Medium so die Differenzierung zu Zellen mesodermalen Ursprungs unterstützt (Johansson und Wiles, 1995; Wiles und Johansson, 1999; Abbildung 6C). Es konnte gezeigt werden, dass BMP-4 in ES-Zellen zusätzlich zu einer zumindest temporären Inhibierung des MAP-Kinase-Signalwegs führt (Qi et al., 2004).

Zwei Transkriptionsfaktoren sind entscheidend an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz in ES-Zellen beteiligt (Abbildung 6D): Der POU-Transkriptionsfaktor Oct-3/4, das Produkt des *Pou5f1*-Gens (POU domain, class 5, transcription factor 1), wird ausschließlich in undifferenzierten, totipotenten und pluripotenten Zellen der Maus exprimiert und beschränkt sich somit während der Differenzierung auf die Zellen der Keimbahn (Pesce et al., 1998; Yeom et al., 1996). Auch kultivierte undifferenzierte ES-Zellen exprimieren *Pou5f1* (Scholer et al., 1989). Oct-3/4 wird *in vitro* für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz benötigt, ist jedoch nicht ausreichend, und eine ektopische Expression ersetzt nicht die Anwesenheit von LIF in *feeder*-freien Kulturen von ES-Zellen (Niwa et al., 2000). Dabei ist nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die Menge an Oct-3/4 entscheidend, da eine Überexpression des Gens ebenfalls zur Differenzierung der Zellen führt. *Pou5f1* ist kein Stat3-reguliertes Gen und seine Expression wird somit auch nicht direkt durch LIF reguliert. Welche Faktoren seine Expression in undifferenzierten Zellen aktivieren, ist noch nicht bekannt. Dass Oct-3/4 auch bei der Etablierung der Pluripotenz der Zellen der ICM eine entscheidende Rolle spielt, zeigten Experimente an *Pou5f1*^{-/-}-Embryonen (Nichols et al., 1998). Welche Gene von Oct-3/4 aktiviert bzw. reprimiert werden, ist bis dato allerdings kaum bekannt. Verschiedene Studien identifizierten mehrere mögliche Kandidaten, darunter das Gen des ECM-Proteins Osteopontin (*Spp1*), *Rex-1*, *Fgf-4*, *Hand1* (*heart and neural crest derivatives expressed 1*) und *Fbx15* (F-Box-Protein 15), welche zumindest teilweise auch abhängig von einer Interaktion von Oct-3/4 mit Sox2 (*SRY-related high-mobility group-box protein 2*) sind (Du et al., 2001; Saijoh et al., 1996; Yuan et al., 1995; Ben-Shushan et al., 1998; Tokuzawa et al., 2003).

Nanog, benannt nach der Insel der ewig Jungen „Tir nan Og“ aus der keltischen Mythologie, erhält bei Überexpression in ES-Zellen, zumindest für einen begrenzten Zeitraum, deren Pluripotenz in Abwesenheit der Aktivierung von Stat3 und Signalen durch BMPs (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Ying et al., 2003). Die Expression von *Nanog* wird möglicherweise unter anderem durch Stat3 aktiviert und inhibiert die durch BMPs induzierte Differenzierung embryonaler Stammzellen

in Richtung mesodermaler Zellen (Pan et al., 2006). Seine Funktion ist allerdings abhängig von der Expression von *Pou5f1* (Chambers et al., 2003). Dabei scheint es zu einer negativen Rückkopplungsschleife zwischen Oct-3/4, Nanog und einem weiteren Transkriptionsfaktor, Foxd3, zu kommen, die deren Expressionsniveaus in undifferenzierten ES-Zellen erhält (Pan et al., 2006).

Neben *Pou5f1* und *Nanog* exprimieren ES-Zellen weitere Gene, die eine Identifizierung pluripotenter Zellen in der Kultur ermöglichen. So sind sie positiv für das ebenfalls von embryonalen Karzinomzellen und Zellen der ICM exprimierte Antigen *stage specific embryonic antigen* (SSEA)-1 (Solter und Knowles, 1978; Martin, 1981) und zeigen eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität, die bei Differenzierung der Zellen verloren geht (Wobus et al., 1984; Pease et al., 1990).

Werden ES-Zellen über eine Blastozystenintegration oder Morulaaggregation in normale Embryonen reintegriert, beteiligen sich diese an der Bildung und Entwicklung aller Gewebe und Organe des chimären Tiers, einschließlich der Keimbahn (Bradley et al., 1984; Wood et al., 1993). Eine der faszinierendsten Eigenschaften der ES-Zellen ist jedoch ihre Fähigkeit, auch *in vitro* in eine ganze Reihe reifer somatischer Zelltypen zu differenzieren.

I.4 Differenzierung embryonaler Stammzellen *in vitro*

Die *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen erfolgt in der Regel durch den Entzug von LIF und/oder *Feeder*-Zellen in serumhaltigem Medium und die Generierung dreidimensionaler, sphärischer Strukturen, so genannten *embryoid bodies* (EBs). Die Generierung der EBs erfolgt dabei entweder durch Kultivierung der Zellen in Suspensionskultur bei hoher Zelldichte (Doetschman et al., 1985), in so genannten *hanging drops* (Wobus et al., 1991), oder in Methylzellulose-haltigem Medium (Wiles und Keller, 1991). In diesen Strukturen laufen Differenzierungsprozesse ab, die denen der frühen Embryonalentwicklung ähneln, und es entstehen Derivate aller drei Keimblätter (Doetschman et al., 1985; Abe et al., 1996; Leahy et al., 1999). Anschließend werden die EBs wieder unter adhärennten Bedingungen kultiviert, wobei verschiedenste spezialisierte Zelltypen auftreten. Dabei wird häufig versucht, durch die Zugabe von spezifischen Faktoren oder die Kultivierung in Selektivmedien eine bevorzugte Differenzierungsrichtung oder eine Anreicherung des gewünschten Zelltyps zu erreichen. Auf diese Weise gelang inzwischen die Generierung einer Vielzahl mehr oder weniger funktionaler Zelltypen wie Kardiomyozyten, neuronale Zellen, hämatopoetische Zellen,

Insulin-produzierende pankreatische Zellen (Inselzellen), Hepatozyten und Keimzellen (jeweils zusammengefasst in: Kumar et al., 2005; Cazillis et al., 2006; Olsen et al., 2006; Soria et al., 2005; Lavon und Benvenisty, 2005; Baughman und Geijsen, 2005).

Die Methode der Differenzierung über EBs in serumhaltigem Medium hat dabei allerdings zwei entscheidende Nachteile: Zum einen beinhaltet das Serum eine Reihe nicht eindeutig identifizierter Faktoren, die zudem von Charge zu Charge teilweise stark differieren. Diese können die Identifizierung und Charakterisierung spezifischer Differenzierungsfaktoren oft verfälschen und somit erschweren. Zum anderen entstehen dabei eine ganze Reihe unterschiedlicher Zelltypen, die miteinander in Wechselwirkung treten und das System damit enorm komplex werden lassen. Eine Abhilfe schaffen hier Differenzierungsprotokolle in chemisch definiertem Medium bzw. Systeme, die eine direkte Differenzierung der ES-Zellen in *Monolayer*-Kulturen erlauben. Zur gezielten Etablierung solcher Protokolle ist allerdings eine detaillierte Kenntnis der zugrunde liegenden Entwicklungsvorgänge erforderlich. Inzwischen wurden verschiedene Differenzierungsprotokolle veröffentlicht, die ohne die Bildung von EBs auskommen. So gelang die Differenzierung von ES-Zellen zu hämatopoetischen Zellen durch die Kultivierung auf OP9-Zellen, einer murinen Bindegewebszelllinie (Nakano et al., 1994). Auch hier kommt es jedoch zu nicht klar definierten Wechselwirkungen, die eine Untersuchung des Differenzierungsprozesses erschweren. Ein weiterer Schritt in Richtung klar definierter Differenzierungsbedingungen ist die Induktion bzw. Steuerung der Differenzierung durch extrazelluläre Matrices. So ermöglicht die Kultivierung von ES-Zellen auf Typ IV-Kollagen ebenfalls eine Generierung hämatopoetischer und endothelialer Zellen (Nishikawa et al., 1998). Auch die Differenzierung zu Keratinozyten kann ohne den Schritt der EB-Bildung erzielt werden, wenn diese auf einer von Fibroblasten sezernierten ECM stattfindet (Coraux et al., 2003). Die Kultivierung auf Komponenten der extrazellulären Matrix aus Amnionhaut wiederum scheint eine Differenzierung zu neuronalen Zellen zu fördern (Ueno et al., 2006). Selbst weibliche Keimzellen können ohne den Zwischenschritt der EB-Generierung aus ES-Zellen entstehen, jedoch kommt es auch bei diesem Protokoll zu einer Bildung vielzelliger Aggregate (Hubner et al., 2003). Im Jahr 2005 gelang erstmals durch die gezielte Zugabe von Faktoren zum Medium auch die Generierung von hepatozytenähnlichen Zellen in *Monolayer*-Kultur (Teratani et al., 2005). Zu erwähnen ist allerdings, dass keines der oben beschriebenen Protokolle zu einer exklusiven Differen-

zierung der ES-Zellen zu dem gewünschten Zelltyp führt und somit auch hier Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellen eine Rolle spielen können.

Der bis heute unter den am besten definierten Bedingungen ablaufende Prozess ist jedoch die Generierung neuronaler Zellen, da diese auch in einem vollständig chemisch definierten Medium in Abwesenheit von Serum und unabhängig von der Anwesenheit weiterer Stimuli ablaufen kann (Tropepe et al., 2001; Ying et al., 2003).

I.4.1 Die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten *in vitro*

Hamazaki und Koautoren veröffentlichten im Jahr 2001 erstmals die Generierung von Hepatozyten durch *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus (Hamazaki et al., 2001; Abbildung 7).

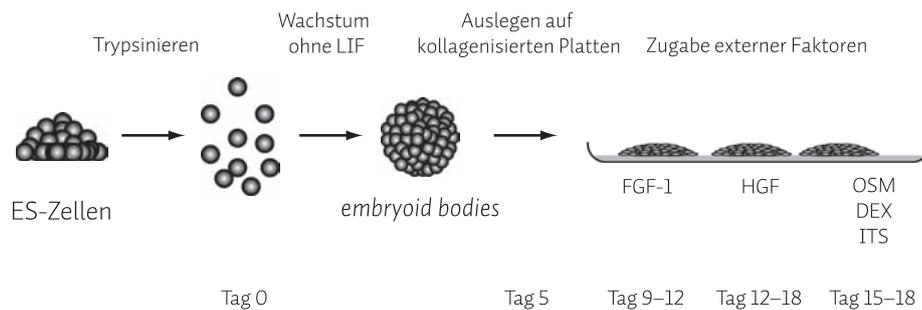


Abbildung 7: Differenzierungsprotokoll nach Hamazaki et al. 2001. Die Differenzierung erfolgt zuerst spontan über die Bildung von *embryoid bodies* und anschließend unterstützt durch die Gabe externer Faktoren auf kollagenisierten Platten. ITS: Insulin, Transferrin und Selensäure.

Die ersten Schritte der Differenzierung erfolgten dabei spontan durch den Entzug von LIF und die Generierung von EBs. Anschließend wurden die EBs auf kollagenisierten Platten ausgelegt, um die Situation der frühen Hepatoblasten nachzuahmen, welche in das Septum Transversum einwandern. Durch die Zugabe von FGF-1 wurde versucht, die induktive Eigenschaft des präkardialen Mesoderms zu ersetzen und so eine Spezifizierung entodermaler Zellen entlang der hepatischen Linie zu erzielen. Anschließend wurde dem Medium HGF zugesetzt, um eine Proliferation der Hepatoblasten zu unterstützen. Die Zugabe von Dexamethason, OSM und einer Mischung aus Insulin, Transferrin und Selensäure (ITS) sollte zu einer weiteren Differenzierung der Hepatoblasten zu reifen Hepatozyten führen. Auf diese Weise gelang ihnen der Nachweis der Expression einer Reihe von Markergenen, welche für die unterschiedlichen Differenzierungsstadien

während der Entwicklung der Hepatozyten charakteristisch sind. Darunter waren Gene wie die für Glukose-6-Phosphatase (G6Pase, G6P) und Tyrosinaminotransferase (TAT), die erst spät während der Entwicklung der Leber exprimiert werden (Pan et al., 1998; Panduro et al., 1987). Dabei schienen vor allem die späten Faktoren für die Generierung reifer Hepatozyten notwendig zu sein, während die frühen Differenzierungsvorgänge scheinbar auch ohne die Zugabe externer Faktoren ablaufen konnten (Hamazaki et al., 2001). Kollagen unterstützte die Differenzierung, war aber ebenfalls nicht notwendig.

Seither wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Publikationen veröffentlicht, welche die Generierung mehr oder weniger reifer Hepatozyten aus ES-Zellen der Maus bzw. der Ratte über den Schritt der EB-Bildung beschreiben (Jones et al., 2002; Yamada et al., 2002; Miyashita et al., 2002; Chinzei et al., 2002; Ishizaka et al., 2002; Kuai et al., 2003; Kanda et al., 2003; Hu et al., 2003; Kania et al., 2003; Hu et al., 2004; Asahina et al., 2004; Kania et al., 2004; Jochheim et al., 2004; Shirahashi et al., 2004; Imamura et al., 2004; Kubo et al., 2004; Choi et al., 2005; Kumashiro et al., 2005; Teramoto et al., 2005; Ogawa et al., 2005; Kulkarni und Khanna, 2006).

Dabei wurden neben den schon oben erwähnten Faktoren ebenfalls FGF-2 (Ishizaka et al., 2002; Kanda et al., 2003), BMP-2 und BMP-4 (Kulkarni und Khanna, 2006), Ascorbinsäure und Nikotinamid (Ishizaka et al., 2002), all-*trans*-Retinsäure (RS) und β -NGF (Kuai et al., 2003) sowie TGF und AFP (Hu et al., 2004) verwendet, um eine Differenzierung der ES-Zellen zu Hepatozyten zu unterstützen. Zudem scheinen ein zeitlich begrenzter Serumentzug und die Zugabe von Activin A die Entstehung entodermaler Zellen in EBs zu fördern und so zu einer gesteigerten Differenzierung entlang der hepatischen Linie zu führen (Kubo et al., 2004). Der Einsatz externer Faktoren ist allerdings nicht unbedingt für die Generierung von Hepatozyten notwendig, da auch ohne ihre Zugabe die Expression später Markergene erzielt werden kann (Yamada et al., 2002; Miyashita et al., 2002; Asahina et al., 2004; Hu et al., 2004; Kumashiro et al., 2005; Ogawa et al., 2005). Dabei kommt es in den differenzierenden EBs zu einer endogenen Synthese notwendiger Faktoren wie z.B. FGF-1 und HGF. Die externe Zugabe induziert die Expression leberspezifischer Gene lediglich zu einem früheren Zeitpunkt (Ogawa et al., 2005; Hu et al., 2004). FGF-1 wird vermutlich, wie auch *in vivo*, von in den Kulturen entstehenden Kardiomyozyten gebildet, deren Auftreten einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung zu hepatozytenähnlichen Zellen hat (Ogawa et al., 2005). Auch weitere, für die Organogenese der Leber und die Differenzierung der

Hepatozyten beschriebene essentielle Wechselwirkungen scheinen in den EBs stattzufinden und bei der Differenzierung eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass parallel zu den Hepatozyten auch endotheliale Strukturen entstehen und diese essentiell für die Bildung der Hepatozyten sind (Ogawa et al., 2005).

Ein weiterer Ansatz, um eine effiziente Differenzierung der ES-Zellen entlang der hepatischen Linie zu erzielen, ist die Überexpression von Transkriptionsfaktoren, welche für die Differenzierung der Hepatozyten *in vivo* eine Rolle spielen. So hat die Expression von *Hnf-3 β* in ES-Zellen einen positiven Einfluss auf die Generierung von Hepatozyten in verschiedenen *in vitro*-Differenzierungsprotokollen (Ishizaka et al., 2002; Kanda et al., 2003). Auch wurde versucht, die EBs auf mit Kollagen beschichteten dreidimensionalen Trägerstrukturen zu kultivieren, was die Bildung lebertypischer, strangähnlicher Strukturen der Hepatozyten unterstützte (Imamura et al., 2004).

Drei Publikationen beschreiben bis dato die Generierung hepatischer Zellen aus murinen ES-Zellen ohne den Zwischenschritt der EB-Bildung. In einem Fall erfolgte die Kultivierung der ES-Zellen zusammen mit embryonalem kardialem Mesoderm (Fair et al., 2003). Im zweiten Fall wurde zuerst die Entstehung von entodermalen Vorläuferzellen durch Gabe von RS induziert und anschließend durch eine Mischung aus FGF-1, FGF-4, und HGF eine Spezifizierung der Zellen entlang der hepatischen Linie erreicht (Teratani et al., 2005; Yamamoto et al., 2005). Diese Zellen konnten anschließend durch Kultivierung auf Kollagen-beschichteten Platten und die Gabe von OSM weiter differenziert werden und zeigten schließlich eine Reihe von Merkmalen, wie sie für reife Hepatozyten typisch sind. Die dritte Veröffentlichung beschreibt die Generierung hepatozytenähnlicher Zellen durch eine viertägige Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und anschließender Gabe von Natriumbutyrat (Sharma et al., 2006). Dabei kommt es zum Absterben eines erheblichen Teils der Zellen, und der Rest der Zellen zeigt verschiedene hepatozytenspezifische Marker.

Ein entscheidendes Problem stellt bei alledem die Identifizierung und die Charakterisierung des Differenzierungszustands der erzeugten Zellen dar. Diese erfolgt in der Regel durch Expressionsanalysen leber- und entwicklungsstadienspezifischer Gene wie *Ttr* (Transtyretin), *Afp* (α -Fetoprotein), *Aat* (α -1-Antitrypsin) und *Hnf-3 β* als frühe Marker und *Alb* (Albumin), *G6p* (Glukose-6-Phosphatase), *Tat* (Tyrosinaminotransferase), *Tdo2* (Tryptophan-2,3-dioxygenase), *Pepck* (Phosphoenolpyruvat-Karboxykinase), verschiedene Zytokeratine und Mitglieder der Zytochrom P450-Familie als mittlere bzw. späte Marker. Problematisch ist dabei jedoch, dass eine

Reihe dieser Marker nicht ausschließlich in Hepatozyten, sondern auch in anderen Geweben und Zelltypen exprimiert wird, wenn auch oft in deutlich geringerem Maße. Eine Ausnahme spielt hier vielleicht *Cyp7A1*, welches scheinbar exklusiv in Hepatozyten exprimiert wird (Asahina et al., 2004).

Einen besseren Weg stellen möglicherweise funktionale Assays dar, wie die Synthese von Harnstoff (Chinzei et al., 2002; Ishizaka et al., 2002; Hu et al., 2004; Shirahashi et al., 2004; Kumashiro et al., 2005) oder die Fähigkeit, Indocyanin-Grün aufzunehmen (Yamada et al., 2002; Kanda et al., 2003). Dabei handelt es sich um ein organisches Anion, das ausschließlich von Hepatozyten aufgenommen wird.

Als entscheidend wird oft angesehen, ob die Zellen *in vivo* die Leber bevölkern und die Funktionen von Hepatozyten übernehmen können. Verschiedene Gruppen transplantierten deshalb ihre mehr oder weniger reifen hepatozytenähnlichen Zellen in Mäuse, die meist zuvor durch teilweise Hepatektomie oder leberschädigende Chemikalien vorbehandelt wurden (Yamada et al., 2002; Chinzei et al., 2002; Imamura et al., 2004; Fair et al., 2005; Teramoto et al., 2005; Teratani et al., 2005). Dabei wurde eine Ansiedlung von Zellen in der Leber beobachtet, welche eindeutig von den differenzierten ES-Zellen abstammten und einen hepatozytentypischen Phänotyp aufwiesen. Auch konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* generierten Zellen die Überlebensdauer von Mäusen in einem chemisch induzierten Modell der Leberzirrhose (Teratani et al., 2005) bzw. Faktor IX-defizienten Mäusen (Fair et al., 2005) verlängern können. Die Aussagekraft dieser Experimente wird jedoch durch Versuche in Frage gestellt, die zeigten, dass auch in die zuvor geschädigte Leber injizierte undifferenzierte ES-Zellen einen hepatischen Phänotyp annehmen (Teratani et al., 2005).

Was den tatsächlichen Differenzierungszustand der durch die Differenzierung von ES-Zellen generierten Hepatozyten betrifft, zeigten Studien, welche die Genexpression der Zellen mittels Mikroarrays (Jochheim et al., 2004), den Metabolismus von Testosteron durch Mitglieder der Zytochrom P450-Familie (Tsutsui et al., 2006) oder den Energiestoffwechsel (Sharma et al., 2006) untersuchten, einen Phänotyp, der eher fetalen als adulten Hepatozyten entspricht.

Auch die Entstehung hepatozytenähnlicher Zellen aus humanen ES-Zellen *in vitro* konnte inzwischen mehrfach gezeigt werden. Diese erfolgte über die Generierung von EBs entweder spontan (Lavon et al., 2004) oder aber unterstützt durch die Gabe von verschiedenen Faktoren wie Insulin und Dexamethason (Shirahashi et al., 2004) bzw. FGF-4 und HGF (Schwartz et al., 2005) auf Typ I-Kollagen beschichteten Platten und Activin A bzw. *insulin-like growth factor* (IGF) in

beschichteten, dreidimensionalen Trägerpolymergerüsten (Levenberg et al., 2003). Auch durch die Zugabe von Natriumbutyrat – sowohl zu EBs als auch in *Monolayer*-Kultur – konnten Zellen erzeugt werden, die einen hepatozytenähnlichen Phänotyp aufwiesen (Rambhatla et al., 2003).

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Die *in vitro*-Differenzierung muriner ES-Zellen stellt ein neues und viel versprechendes System dar, die komplizierten Vorgänge während der Embryonalentwicklung der Säugetiere, und damit nicht zuletzt des Menschen, besser verstehen zu lernen. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Möglichkeit, auf Tierexperimente verzichten und aufgrund der leichten Zugänglichkeit des Systems, Ergebnisse schnell auf ihre Relevanz hin überprüfen zu können. Die Veröffentlichung mehrerer Protokolle, welche die Generierung hepatozytenähnlicher Zellen aus murinen ES-Zellen beschreiben, eröffnet dabei nun auch die Möglichkeit, die Organogenese der Leber in diesem System genauer zu untersuchen. Dies kann zum einen durch die Untersuchung des Einflusses externer Faktoren auf den Differenzierungsprozess geschehen, zum anderen besteht die Möglichkeit, differentielle Genexpressionsstudien durchzuführen, um neue Gene zu identifizieren, die an der Entwicklung der Hepatozyten beteiligt sind. Da alle bis dato beschriebenen Protokolle jedoch in einem Gemisch einer Vielzahl verschiedener Zelltypen resultieren, bedarf es Methoden, welche die Identifizierung und Isolierung möglichst reiner Populationen vitaler Vorläuferzellen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien ermöglichen. Leider besitzen aber weder reife Hepatozyten noch ihre Vorläuferzellen spezifische Oberflächenmarker, die eine Isolierung mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) ohne weiteres ermöglichen. Eine Abhilfe könnten ES-Zelllinien schaffen, welche die Fähigkeit besitzen, einen Selektionsmarker unter der Kontrolle zell- und entwicklungs-spezifischer Promotoren zu exprimieren. Als Marker könnten dabei Gene dienen, die für Antibiotikaresistenzen oder für Fluoreszenzproteine kodieren. Letztere haben den Vorteil, dass mit ihrer Hilfe nicht nur eine Isolierung entsprechender Zellen möglich wäre, sondern auch eine qualitative und quantitative Untersuchung des Differenzierungsprozesses und des Einflusses etwaiger Faktoren erfolgen könnte. Diese Analysemethode hat gegenüber anderen Methoden, wie etwa der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie oder der RT-PCR (an eine reverse Transkription gekoppelte Polymerase-Kettenreaktion), entscheidende Vorteile. Die indirekte

Immunfluoreszenzmikroskopie lässt zwar eine Aussage über den Anteil an positiven Zellen zu, eine Quantifizierung der Genexpression in einzelnen Zellen ist jedoch nur schwer möglich. Die RT-PCR hingegen lässt zwar eine Quantifizierung zu, gibt jedoch keinen Aufschluss, ob eine gesteigerte Genexpression durch eine Zunahme an exprimierenden Zellen in der Kultur oder durch eine erhöhte Expression in einer konstant gebliebenen Anzahl an Zellen verursacht wird. Zudem ist die Methode äußerst anfällig für Kontaminationen.

Das Ziel der Arbeit war die Etablierung eines *in vitro*-Systems, welches die Quantifizierung des Differenzierungsprozesses muriner embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten sowie die Identifizierung und Charakterisierung differenziell regulierter Gene während der Entwicklung ermöglicht. Hierfür sollte eine *Feeder*-Zellen-freie Kultur muriner ES-Zellen und ein *in vitro*-Differenzierungsprotokoll im Labor etabliert und, wenn möglich, optimiert werden, welches die Generierung von Hepatozyten aus murinen ES-Zellen ermöglicht. Zudem sollten Reporterkonstrukte geschaffen werden, die eine Identifizierung, Quantifizierung und Isolierung von Zellen zu unterschiedlichen Zeiten des Differenzierungsprozesses ermöglichen. Diese sollten stabil in das Genom undifferenzierter ES-Zellen integriert und die resultierenden Zelllinien schließlich bezüglich ihrer Tauglichkeit in dem etablierten Differenzierungsprotokoll charakterisiert werden.

II Material

II.1 Chemikalien

Standardchemikalien wurden, wenn nicht explizit aufgeführt, in der größtmöglichen Reinheit von den Firmen Sigma-Aldrich (München), CARL ROTH (Karlsruhe) bzw. Merck (Darmstadt) bezogen.

II.2 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden bei den Firmen Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) und Promega (Madison, USA) erworben.

II.3 Einwegmaterialien für die Zellkultur

Sämtliche Einwegmaterialien, die bei der Kultivierung von Säugerzellen zum Einsatz kamen, stammten von der Firma TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz).

MATERIAL

II.4 DNA-Größenstandards

peqGOLD 100 bp DNA-Leiter (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

peqGOLD 1 kb DNA-Leiter (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)

II.5 Antikörper

Sämtliche in dieser Arbeit verwendete Antikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Verwendeter Antikörper	Verdünnung
Kaninchen-anti-Mausalbumin Serum (Nordic Immunological Laboratories)	1:80
Kaninchen-anti-Arginase I (H-52) polyklonale IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)	1:100
Maus-anti-Oct-4 (C-10) monoklonale IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)	1:150
FITC-gekoppelte Pferd-anti-Kaninchen IgG (Vector Labs, USA)	1:400
Cy ³ TM -gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)	1:800
Cy ⁵ TM -gekoppelte Pferd-anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)	1:800
Cy ³ TM -gekoppelte Ziege anti-Maus IgG (Dianova, Hamburg)	1:800

II.6 Verwendete Promotor/Enhancer-Konstrukte

Das TTR-Promotor/Enhancer-Konstrukt beinhaltet 2800 bp vor dem Startkodon des TTR-Gens (-2773 bis +26; -3kb-TTR-Promotor). Es enthält somit sowohl den ca. 200 bp langen Promotor als auch den etwa 2 kb weiter aufwärts gelegenen Enhancer (Costa et al., 1988). Das Konstrukt zeigt eine hepatomzelllinienspezifische Expression *in vitro* und führt auch während der Embryogenese in transgenen Mäusen zu einem für das TTR-Gen charakteristischen Expressionsmuster, welches sich auf Zellen der Leber, des Dottersacks und des *Plexus choroideus* beschränkt (Costa et al., 1986; Costa et al., 1990; Yan et al., 1990).

Das ALB-Promotor/Enhancer-Konstrukt besteht aus einem 335 bp großen Bereich vor dem Startkodon (-317 bis +18) und einem ca. 10 kb oberhalb des Albumingens gelegenen Abschnitt mit einer Länge von etwa 2 kb (äquivalent zu Konstrukt NB; Pinkert et al., 1987). Es enthält den Albuminpromotor und verschiedene Enhancer-Elemente, die zu einer starken leberspezifischen Expression nachgeschalteter Gene in transgenen Mäusen führen (Pinkert et al., 1987; Herbst et al., 1989).

Der G6Pase-Promotor wurde mittels des Primerpaares G6Pr_FW_Bgl/G6Pr_BW_Not aus der genomischen DNA von FVB-Mäusen (FVB/N Cr1BR) amplifiziert und enthält die Region von -770 bis +68 relativ zum Startpunkt der Transkription des G6Pase-Gens. Er enthält alle bis dato bekannten, regulatorisch relevanten Bereiche des murinen G6Pase-Gens (Streper et al., 1997; Streper et al., 2001; Boustead et al., 2003).

II.7 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen. Die Sequenzen, *Annealing*-Temperaturen und ihr vornehmlicher Einsatz sind aus den Tabellen 2–5 zu entnehmen.

Tabelle 2: RT-PCR-Primer zur Charakterisierung der Genexpression hepatozytenspezifischer Gene während der *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus

Primername	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur	Bemerkung
TTR_FW	GGCTGAGTCTCTCAATTC	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Transthyretin-Gens
TTR_BW	CTCACACAGATGAGAAG	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Transthyretin-Gens
AAT_FW	AAGACTGTAGCTGCTGCAGC	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des α -1-Antitrypsin-Gens
AAT_BW	AATGGAAGAAGCCATTGAT	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des α -1-Antitrypsin-Gens
AFP_FW	AGGCTTTTGCTTCACCAG	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des α -Fetoprotein-Gens
AFP_BW	TCGTATTCCAACAGGAGG	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des α -Fetoprotein-Gens
ALB_FW	CAGGATTGCAGACAGATAGTC	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Albumin-Gens
ALB_BW	GCTACGGCACAGTGCTTG	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Albumin-Gens
G6P_FW	GTTGCTGTAGTAGTCGGT	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Glukose-6-Phosphatase-Gens
G6P_BW	CAGGACTGGTTCATCCTT	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Glukose-6-Phosphatase-Gens
TAT_FW	TCCCGACTGGATAGGTAG	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Tyrosinaminotransferase-Gens
TAT_BW	ACCTTCAATCCCATCCGA	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des Tyrosinaminotransferase-Gens
b.act_FW	GAGCAATGATCTTGATCTTC	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des β -Actin-Gens
b.act_BW	TTCCTTCTGGGTATGGAAT	55,5 °C	Primer zur Analyse der Expression des β -Actin-Gens

MATERIAL

Tabelle 3: Primer zur Genotypisierung stabil transfizierter ES-Zellklone

Primername	Sequenz (5'–3')	Annealing-Temperatur	Bemerkung
nucGFP_FW.G	CCAAAGAAGAAGCGTAAGGTAATCG	63 °C	ebenfalls zur Analyse der <i>nucGFP</i> -Expression (GFP5 mit vorangeschalteter Kernlokalisations-Sequenz) in der RT-PCR eingesetzt
nucGFP_BW.G	CATAAGAGAAAGTAGTGACAAGTGTGGC	63 °C	ebenfalls zur Analyse der <i>nucGFP</i> -Expression in der RT-PCR eingesetzt
DsRed2_FW.G	CTCCGAGAACGTCATCACCG	66 °C	ebenfalls zur Analyse der <i>DsRed2</i> -Expression in der RT-PCR eingesetzt
DsRed2_BW.G	CAGGATGTCCAGGCGAAG	66 °C	ebenfalls zur Analyse der <i>DsRed2</i> -Expression in der RT-PCR eingesetzt
EXFP_FW.G	TGAGCAAGGGCGAGGAGC	67 °C	ebenfalls zur Analyse der <i>eCFP</i> -Expression in der RT-PCR eingesetzt
EXFP_BW.G	GGTGGTCACGAGGGTGGG	67 °C	ebenfalls zur Analyse der <i>eCFP</i> -Expression in der RT-PCR eingesetzt
TTRPr_BW.G	ATGAACAACCCTGGCTGG	56 °C	
2335A1-BW	GCTGGAAAAGTGAATGAG	56 °C	
b.tub_FW	TCACTGTGCCTGAACTTACC	56 °C	zur Überprüfung der Integrität genomischer DNA
b.tub_BW	GGAACATAGCCGTAACCTGC	56 °C	zur Überprüfung der Integrität genomischer DNA

Tabelle 4: Sequenzierprimer. Zusätzlich zu den in der Tabelle angegebenen Primern kamen auch ursprünglich zur Genotypisierung oder Klonierung bestimmte Primer in Sequenzierreaktionen zum Einsatz.

Primername	Sequenz (5'–3')	Annealing-Temperatur	Bemerkung
pROSA_FW	TCCTGGCTTCTGAGGACC	58 °C	Primer zur Sequenzierung der Übergänge von in pROSA26-1 klonierten Inserts
pROSA_BW	CCTGTTCAATTCCCCTGC	58 °C	Primer zur Sequenzierung der Übergänge von in pROSA26-1 klonierten Inserts
2335A1-2159FW_Seq	TGTGAAAAGCAGTGGTGC	56 °C	Primer zur Sequenzierung der Übergänge von hinter den ALB-Promotor/Enhancer klonierten Inserts
BsdDel_FW	CTTGTGCAGAACTCGTGG	52 °C	Primer zur Sequenzierung aus dem Zeocinresistenzgen hinaus
RetroXR_FW	TTCCGAGGGACACTAGGCTGAC	60 °C	Primer zur Sequenzierung der Übergänge von in pQCXIX klonierten Inserts
RetroXR_BW	CATTCCCCCTTTTCTGGAG	60 °C	Primer zur Sequenzierung der Übergänge von in pQCXIX klonierten Inserts
pQC_FW	AAGCGGCTTCGCCAGTAACGTTA	60 °C	Primer zur Sequenzierung der Übergänge von in pQCXIX klonierten Inserts
pQC_BW	ACGCCATCCAGCTGTTTTGACCT	60 °C	Primer zur Sequenzierung der Übergänge von in pQCXIX klonierten Inserts

Tabelle 5: Klonierungsprimer. Die Sequenzen enthaltener Restriktionsendonuklease-Schnittstellen sind unterstrichen.

Primername	Sequenz (5'–3')	Annealing-Temperatur	Bemerkung
G6Pr.FW.Bgl	TTGCA <u>AGATCT</u> CATGTGCATTGGTGGCTT TTTGCTGC	63 °C	enthält BglII-Linker
G6Pr.BW.Not	CTAGAG <u>CGGCCCG</u> GTACCTCAGGAAGCTG CCAGCAGAGCCC	63 °C	enthält NotI-Linker, ebenfalls zur Genotypisierung eingesetzt
eCFP-BamFW	CGG <u>GATCC</u> GCCACCATGGTGAGCAAG	54 °C	enthält BamHI-Linker
eCFP-BamBW	CGG <u>GATCC</u> TTACTTGTACAGCTCGTCCAT G	54 °C	enthält BamHI-Linker

II.8 Plasmide

II.8.1 Kommerziell erhältliche Plasmide

pQCXIN	Bestandteil des <i>RetroX™ Q retroviral expression Kit</i> (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA); ermöglicht die Expression eines Gens unter Koexpression des Neomycin-Resistenzgens (Abbildung 8).
pQCXIP	Bestandteil des <i>RetroX™ Q retroviral expression Kit</i> (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA); ermöglicht die Expression eines Gens unter Koexpression des Puromycin-Resistenzgens.
pQCXIH	Bestandteil des <i>RetroX™ Q retroviral expression Kit</i> (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA); ermöglicht die Expression eines Gens unter Koexpression des Hygromycin-Resistenzgens.
pDsRed2-N1	Diente als Quelle des DsRed2-ORFs (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA)
peCFP-ER	Diente als Quelle des <i>enhanced cyan fluorescent protein</i> (eCFP)-ORFs (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA)

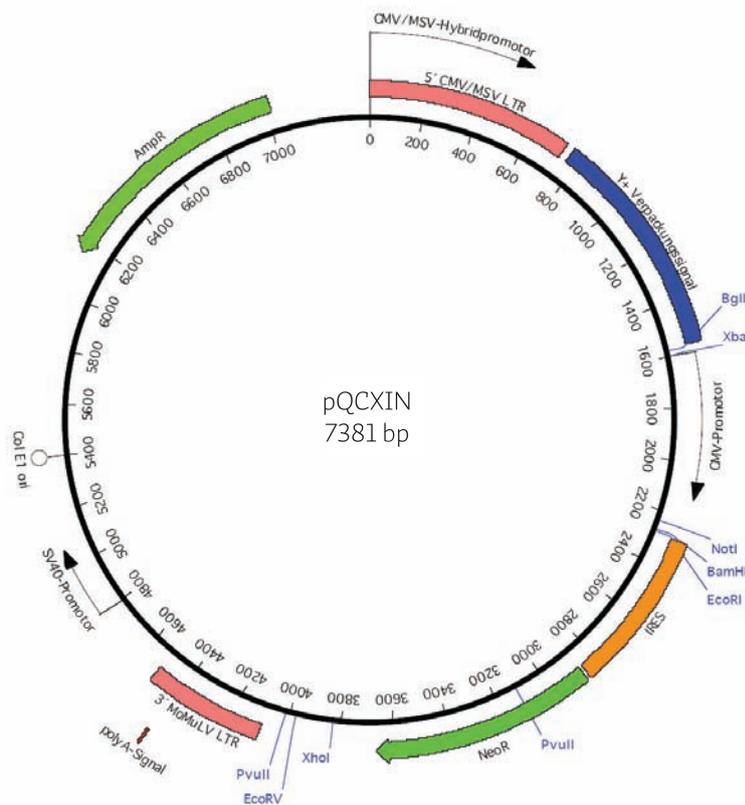


Abbildung 8: Aufbau der RetroX™ Q-Vektoren am Beispiel des pQCXIN. Bei den Vektoren des RetroX Q retroviral expression Kit handelt es sich um bicistronische retrovirale Expressionsvektoren welche die Expression eines Zielgens unter der Ko-Expression eines Resistenzmarkers ermöglichen. Nach Transfektion in eine adäquate Verpackungszelllinie kommt es zur Expression eines viralen genomischen Transkripts, welches den Cytomegalovirus (CMV) immediate early-Promotor, das gewünschte Gen, eine internal ribosomal entry site (IRES) und das Gen eines Selektionsmarkers (NeoR) enthält. Die 5'-LTR besteht aus dem CMV-Typ I-Enhancer und dem Maus-Sarkom-Virus (MSV)-Promotor. Die 3'-LTR enthält eine Deletion in der Enhancer-Region. Während der reversen Transkription der retroviralen RNA wird die 3'-LTR verdoppelt und ersetzt die 5'-LTR, was zu einer Inaktivierung der 5'-LTR-Enhancer-Region führt. Dadurch soll das Phänomen der Promotor-Interferenz reduziert werden. Das virale Transkript enthält zudem das benötigte Verpackungssignal (Ψ^*) sowie eine Bindungsstelle für den während der reversen Transkription benötigten tRNA-Primer. Ebenfalls im Vektor enthalten sind ein bakterieller Replikationsursprung (Col E1 ori) sowie das E. coli Ampicillinresistenzgen (AmpR). In der Karte zusätzlich eingetragen sind die Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen.

- pcDNA3.1(-) Eukaryotischer Expressionsvektor; ermöglicht Expression eines Zielgens unter der Kontrolle des CMV_{EA}-Promotors (Invitrogen, Karlsruhe)

- pEGFP-N1 Eukaryotischer Expressionsvektor; ermöglicht Expression des enhanced green fluorescent protein-Gens (eGFP) unter der Kontrolle des CMV_{EA}-Promotors (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA)

II.8.2 Nicht kommerziell erhältliche Plasmide

pDR1BSD	Diente als Quelle des PGK-Promotors und des Zeocinresistenzgens (ORF); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Lars Stöckl, Charité, Berlin
pCAGGS(Linker)	Basiert auf pCAGGS (Niwa et al., 1991); enthält CAG-Hybridpromotor (CMV _{EA} -Enhancer / <i>chicken</i> β -Actin-Promotor / <i>rabbit</i> β -Globin-Intron); starke Expression in ES-Zellen; enthält zusätzliche Schnittstellen in der <i>multiple cloning site</i> (MCS); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Lars Stöckl, Charité, Berlin
p2335A-1	pBlueskript-basierter Vektor; enthält Albumin (ALB)-Promotor/Enhancer-Konstrukt (siehe II.6), mit freundlicher Genehmigung von Richard D. Palmiter, Howard Hughes Medical Institute, University of Washington, Seattle
pcDNA3_TTR-nucGFP	Enthält –3kb-TTR-Promotor (siehe II.6) vor der Sequenz des nucGFP-Gens (GFP5 mit vorangeschalteter Kernlokalisationssequenz) (Tosh et al., 2002b). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von David Tosh, University of Bath, UK
pROSA26-1	<i>Targeting</i> -Vektor zur homologen Rekombination von Genen in den ROSA26-Lokus (Soriano, 1999), enthält ORF des Diphtherie-Toxin-A-Fragmentes zur negativen Selektion nicht durch homologe Rekombination entstandener resistenter Kolonien

II.8.3 Im Zuge dieser Arbeit generierte Plasmide

II.8.3.1 Plasmide zur transienten Expression in eukaryotischen Zellen

p2335A-1DsRed2_polyA	ALB-Promotor/Enhancer → DsRed2-ORF → SV40 polyA in p2335A1
pcDNA3.1G6P-DsRed2	G6Pase-Promotor (−770 → +68) → DsRed2-ORF in pcDNA3.1(−)

II.8.3.2 Plasmide zur Generierung rekombinanter Moloney-Maus-Leukämie-Virus-basierter Retroviren

pQC-eCFPIP	eCFP-ORF in pQCXIP
pQCAG-eCFPIP	CAG-Promotor → eCFP-ORF in pQCXIP (der interne CMV-Promotor wurde dabei ersetzt)
pQTTR-nucGFPIP_PGK-ZeoR	−3kb-TTR-Promotor → nucGFP-ORF → IRES → Puro ^R → PGK-Promotor → Zeo ^R in pQCXIP (der interne CMV- Promotor wurde dabei ersetzt)
pQALB-eCFPIH_PGK-ZeoR	ALB-Promotor/Enhancer → eCFP-ORF → IRES → Hygro ^R → PGK-Promotor → Zeo ^R in pQCXIH (der interne CMV- Promotor wurde dabei ersetzt)
pQG6P-DsRed2IN_PGK-ZeoR	G6Pase-Promotor → DsRed2-ORF → IRES → Neo ^R → PGK- Promotor → Zeo ^R in pQCXIH (der interne CMV- Promotor wurde dabei ersetzt)

II.8.3.3 Plasmide zur stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen durch homologe Rekombination

pROSA26_TTR-nucGFP_PGK-ZeoR	-3kb-TTR-Promotor → nucGFP-ORF → PGK-Promotor → Zeo ^R → BGH polyA in pROSA26-1
pROSA26_ALB-eCFP_PGK-ZeoR	ALB-Promotor/Enhancer → eCFP-ORF → PGK-Promotor → Zeo ^R → BGH polyA in pROSA26-1
pROSA26_G6P-DsRed2_PGK-ZeoR	G6Pase-Promotor → DsRed2-ORF → PGK-Promotor → Zeo ^R → BGH polyA in pROSA26-1

II.9 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> K12 DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe	F ⁻ Φ 80dlacZ Δ (M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i> XL10-Gold*	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a

MATERIAL

II.10 Zelllinien

CGR8	embryonale Stammzelllinie der Maus, etabliert aus der inneren Zellmasse eines männlichen 3,5 Tage alten Präimplantationsembryos (<i>Mus musculus</i> , Stamm 129); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Heinz Himmelbauer vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin (ECACC No. 95011018)
NIH3T3	embryonale Fibroblastenzelllinie der Maus, etabliert aus einem NIH/Swiss-Mausembryo (ECACC No. 93061524)
293	humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit gescherter humaner Ad5-DNA (ECACC No. 85120602)
HuH-7	humane Hepatomzelllinie, etabliert aus einem hepatozellulären Karzinom (Nakabayashi et al., 1982)
HepG2	humane Hepatomzelllinie, etabliert aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen kaukasischen Jungen (ECACC No. 85011430)
HeLa	humane Epithelzelllinie, etabliert aus einem humanen Papillomavirus 18 positiven Adenokarzinom aus der Zervix einer 31-jährigen Afroamerikanerin (ECACC No. 93021013)
BD EcoPack2™-293 Zellen	293-basierte Verpackungszelllinie, entwickelt für die Produktion ecotropischer Retroviren. Bleomycin- und Hygromycinresistent; produzierte Viren tragen gp70-Oberflächenprotein, welches die Infektion mCAT-1-positiver Zellen der Maus oder der Ratte ermöglicht (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA)

III Methoden

III.1 Molekularbiologische Methoden

Die hier nicht aufgeführten Methoden wie z.B. der Umgang mit Bakterien und ihre Vermehrung sowie Standardmethoden im Umgang mit Nucleinsäuren wurden wie in „*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*“ (Sambrook und Russell, 2001) beschrieben durchgeführt.

III.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) erlaubt die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mit bekannter Sequenz der flankierenden Bereiche (Mullis und Faloona, 1987). Sie kann somit sowohl zur Vervielfältigung gewünschter DNA-Bereiche als auch zu ihrem spezifischen Nachweis eingesetzt werden. Im Umfang dieser Arbeit wurde sie zur Amplifizierung und anschließender Klonierung kurzer DNA-Bereiche, zum schnellen Nachweis positiv transformierter Bakterien (Kolonie-PCR), zum Nachweis der Integration spezifischer DNA-Sequenzen nach erfolgter Transfektion eukaryotischer Zellen sowie zur Analyse und Quanti-

METHODEN

fizierung von Genexpression im Zuge einer RT-PCR (*reverse transcription linked PCR*) eingesetzt.

Wurde die so amplifizierte DNA für spätere Klonierungen verwendet, kam eine DNA-Polymerase mit *proofreading*-Aktivität zum Einsatz (Herculase Enhanced DNA-Polymerase, Stratagene, Niederlande). Für analytische Zwecke wurde die Reaktion mit Platinum® *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) mit *hot start*-Funktion durchgeführt.

Ein 25 µl PCR-Ansatz enthielt typischerweise 10–250 ng DNA-Matrize, 4 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP in gleichen Anteilen; Bioline GmbH, Luckenwalde), 2 mM MgCl₂, 1,25 µM *forward* (FW)-Primer, 1,25 µM *backward* (BW)-Primer, 1 U DNA-Polymerase in 1x-PCR-Reaktionspuffer. Die *Annealing*-Temperatur der Primer wurde in Abhängigkeit ihrer Sequenzen gewählt. Einen ersten Anhaltspunkt gab hierbei die Berechnung der *Annealing*-Temperatur mit Hilfe des Programms „MacVector 7.0“. Sie wurde anschließend, wenn nötig, so weit angepasst, bis eine maximale Ausbeute an PCR-Produkt bei einer minimalen Anzahl an Nebenprodukten erzielt wurde. Bei der Verwendung von Primern mit unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen wurde sich an der niedrigeren orientiert. Die *Annealing*-Zeit betrug 1 min. Die Amplifikation erfolgte bei 68 °C (Herculase Enhanced DNA-Polymerase) bzw. 72 °C (Platinum® *Taq* DNA-Polymerase) für etwa 1 min pro 1 kb zu amplifizierendem Fragment. Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach der Menge der eingesetzten Matrize sowie der Effizienz der Reaktion und lag typischerweise zwischen 25 und 40.

III.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Abhängig von der benötigten Menge an DNA wurde die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN, Hilden) für Präparationen von >20 µg DNA bzw. des QIAGEN Plasmid Maxi Kits für Präparationen von >20 µg DNA durchgeführt. Hierfür wurden *E. coli*, welche das gewünschte Plasmid trugen, ü.N. bei 37 °C in einem entsprechenden Volumen an LB-Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin) angezogen und anschließend nach den Angaben des Herstellers verfahren.

III.1.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Zellen

Die Isolierung chromosomaler DNA aus Vertebratenzellen erfolgte im 24-Well-Format. Die Zellen wurden mit ca. 1 ml PBS pro Well gewaschen. Dann wurden 250 µl Lysepuffer zugegeben (0,5 mg/ml Proteinase K in 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% SDS, 10 mM Tris, pH 7,4), die 24-Well-Platten in feuchte Tücher gepackt, in Kunststofftüten eingeschweißt, für 20 min bei 65 °C inkubiert und anschließend ü.N. bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden zu jedem Well 250 µl Hochsalzpuffer zugegeben (650 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,4) und die Proben in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zu den Proben wurde 500 µl Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzupipettiert (redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, pH 7,5–8,0; CARL ROTH, Karlsruhe), die Proben für 1 min vorsichtig geschüttelt, zentrifugiert (10 min, 16000 g, RT) und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, erneut für 1 min vorsichtig geschüttelt, zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,25 Volumina 10 M Ammoniumacetat und 0,7 Volumina Isopropanol wurde die DNA für mindestens 2 Stunden bei –20 °C gefällt, bei 16000 g pelletiert, 1x mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und an der Luft bei RT getrocknet. Die DNA wurde im Anschluss mit einer Konzentration von etwa 0,5 mg/ml in 10 mM Tris, pH 8,0, gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

III.1.4 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Musste DNA nach einer PCR oder nach enzymatischer Modifikation für ihre weitere Verwendung gereinigt werden (Entfernung von Puffersubstanzen oder Enzym), erfolgte dies mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben.

III.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte nach dem Ausschneiden der gewünschten Bande mit einem sterilen Skalpell mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

III.1.6 RNA-Isolierung

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurden für alle Arbeiten mit RNA, wenn möglich, sterile Einmal-Plastikprodukte verwendet. Glasware wurde für 8 Stunden bei 180 °C gebacken. Hitzelabile Produkte wurden, wenn möglich, mit Chloroform oder zuerst mit 1% (w/v) SDS und dann mit reinem Äthanol gespült. Sämtliche verwendete Lösungen und Puffer wurden, wenn möglich, mit DEPC behandelt oder aber aus RNase-freien Reagenzien angesetzt. Die Lagerung von RNA erfolgte stets bei -70 °C.

Extraktion von Gesamt-RNA

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe erfolgte mit Hilfe des peqGOLD TriFast™-Reagenzes (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Dabei handelt es sich um eine monophasische Phenol-/Guanidinisothiocyanat-Lösung zur gleichzeitigen Extraktion von RNA, DNA und Proteinen. Die Methode basiert auf einer Ein-Schritt-Flüssigphasen-Separation entwickelt von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Extraktion erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers mit folgenden Abweichungen bzw. Besonderheiten:

Die Lyse von Zellen in *Monolayer*-Kulturen erfolgte nach vollständiger Aspiration des Mediums wie angegeben durch die direkte Zugabe des Reagenzes und anschließendes mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen mit einer Pipette. Die Menge an TriFast™-Reagenz wurde jedoch auf 1,25 ml pro 10 cm² Wachstumsfläche erhöht, um eine Verunreinigung der gereinigten RNA durch DNA zu verringern. Die Homogenisierung von Lebergewebe der Maus erfolgte mit Hilfe eines Glas-Homogenisators in nicht weniger als 1 ml Reagenz pro 50 mg Gewebe. Die Lyse von auf Kollagen ausgewachsenen *embryoid bodies* erfolgte durch Abschaben der Zellen in 1,25 ml TriFast™-Reagenz pro 10 cm² Wachstumsfläche und anschließender Homogenisierung im Glas-Homogenisator.

Das Waschen der durch Isopropanol gefällten RNA erfolgte entgegen den Angaben mit 75 %igem sauren Ethanol (75% (v/v) Ethanol, 25 % (v/v) 0,1 mM Natriumacetat-Lösung, pH 5,2). Dies ändert die Konsistenz des RNA-Pellets, erhöht somit die Haftung am Boden des Zentrifugenröhrchens und erleichtert ein vollständiges Entfernen des Überstandes.

Entfernung von DNA-Kontaminationen

Um die isolierte DNA für eine spätere RT-PCR von eventuellen DNA-Kontaminationen zu befreien, wurde die RNA im Anschluss an die Isolierung einem DNase I-Verdau unterzogen. Hierfür wurde die Gesamt-RNA auf 0,1 µg/ml verdünnt und mit 1 U RQ1-RNase-free-DNase (Promega, Madison, USA) pro µg RNA und 1 U/µl RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) für 30 min bei 37 °C im mitgelieferten 1x RNase-Reaktionspuffer inkubiert. Bei starker Kontamination der Proben wurde anschließend erneut die gleiche Menge an Enzym zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden danach durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion gereinigt.

III.1.7 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Um RNA nach erfolgtem DNase I-Verdau für eine folgende cDNA-Synthese von störendem Enzym und Puffersubstanzen zu trennen, wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurden die Proben mit nukleasefreiem Wasser auf 400 µl aufgefüllt, 400 µl Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzupipettiert (redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, pH 7,5–8,0; CARL ROTH, Karlsruhe) und für 1 min stark geschüttelt. Die Proben wurden 1 min bei RT mit 13000 g zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und erneut geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 40 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 1 ml reinem Ethanol versetzt, gevortext und die RNA für mindestens 2 h bei –20 °C gefällt. Anschließend wurde die gefällte RNA für 20 min bei 13000 g und 4 °C pelletiert, mit 1 ml saurem Ethanol gewaschen (75 % (v/v) Ethanol, 25 % (v/v) 0,1 mM Natriumacetat-Lösung, pH 5,2), das Pellet für ca. 10–15 min bei RT im offenen Reaktionsgefäß getrocknet und in nukleasefreiem Wasser gelöst (Ausubel, 1997).

III.1.8 Isolierung von polyA-RNA aus Gesamt-RNA

Die Isolierung von polyA-RNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des NucleoTrap mRNA Mini Purification Kit (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, USA) nach den Angaben des Herstellers.

III.1.9 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurepräparationen

Die Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Diese Wellenlängen entsprechen den Absorptionsmaxima von DNA bzw. RNA und dem von Proteinen. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei etwa einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zur Extinktion bei 280 nm spiegelt den Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation wieder. Es liegt für reine DNA bei ca. 1,6 bis 1,8 und für reine RNA bei ca. 1,8 bis 2,0. Im Falle von Gesamt-RNA wurde zusätzlich 1 μg der RNA durch Agarosegelelektrophorese (1 % (w/v) Agarose) aufgetrennt und auf die Integrität der ribosomalen 28s und 18s RNA hin überprüft. Bei intakter, nicht degradierter RNA sollte das Intensitätsverhältnis der 28s- zur 18s-Bande größer als 1,5 sein.

III.1.10 RT-PCR

cDNA-Synthese

Ein Umschreiben von mRNA in cDNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase (reverse Transkription, RT) ermöglicht einen späteren Nachweis spezifischer mRNA-Moleküle mittels PCR (RT-PCR). Dadurch lassen sich Aussagen über die Expression von Genen machen und eine Analyse ihrer Expressionsstärke durchführen. Standardmäßig wurde die Reaktion mit DNase I-verdauter Gesamt-RNA durchgeführt. Zum Nachweis schwacher Genexpression wurde gereinigte polyA-RNA eingesetzt. Hierfür wurde 1 μg RNA mit 0,5 μg Oligo(dT)-Primern (Promega, Madison, USA) und nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 11 μl gebracht, 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dabei werden mögliche Sekundärstrukturen der RNA zerstört und eine Anlagerung der Oligo(dT)-Primer an die polyA-Enden der mRNA ermöglicht. Anschließend wurde ein Mastermix hergestellt, der pro Ansatz aus 1 μl RNasin® Ribonuclease

Inhibitor, 1,5 μ l AMV-Reverse Transkriptase (10 U/ μ l), 5 μ l 5x-RT-Reaktionspuffer (Promega, Madison, USA), 1 μ l einer 100 mM dNTP-Lösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP in gleichen Anteilen; Bioline GmbH, Luckenwalde) und 5,5 μ l nukleasefreiem Wasser bestand, und zu der RNA/Primer-Mischung gegeben. Die Ansätze wurden sodann für 60 min bei 45 °C inkubiert und das Enzym im Anschluss für 5 min bei 70 °C inaktiviert. Um sicherzustellen, dass in einer späteren PCR generierte Produkte nicht aus einer DNA-Kontamination entstanden sind, wurde pro Probe ein zweiter Ansatz durchgeführt, der Wasser anstatt der Reversen Transkriptase enthielt (RT-Negativ-Kontrolle).

PCR

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der Expression von Genen wurde im Anschluss an die cDNA-Synthese eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Die Primersequenz wurde dabei so gewählt, dass der zu amplifizierende Bereich, wenn möglich, Exongrenzen überspannte. Dies sollte verhindern, dass es bei einer Kontamination der cDNA-Proben mit genomischer DNA zu einem PCR-Produkt kommt oder aber zumindest eine Unterscheidung anhand der Größe des amplifizierten Fragments ermöglichen. Die Reaktion erfolgte wie unter III.1.1 beschrieben. Standardmäßig wurden 0,5–1 μ l cDNA pro Reaktion eingesetzt. Sollte eine Quantifizierung der Genexpression erfolgen, wurde die cDNA abhängig von der Stärke des Signals zuvor verdünnt oder die Anzahl der Zyklen verringert, um zu gewährleisten, dass die Amplifikation noch kein Plateau erreicht hatte.

III.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäurefragmente unterschiedlicher Länge lassen sich aufgrund ihrer negativen Ladung mittels Elektrophorese trennen. Die Trennung erfolgte standardmäßig über horizontale Elektrophorese mit Agarosegelen zwischen 0,7 % und 2 % (w/v) Agarose (Promega, Madison, USA) in TAE-Puffer (30 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0). Die Nukleinsäure-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,2 Volumina DNA-Probenpuffer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) versetzt, um ein Einsinken in die Geltaschen zu gewährleisten. Die Elektrophorese erfolgte mit TAE-Laufpuffer bei ca. 10 V/cm Elektrodenabstand. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte mit Ethidiumbromid, welches mit einer Konzentration von 50 ng/ml mit in

das Gel eingegossen wurde. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix bzw. in die teilweise doppelsträngigen Bereiche nicht denaturierter RNA. Die Nukleinsäuren lassen sich anschließend unter UV-Licht durch eine orange Fluoreszenz visualisieren. Die Anregung erfolgte bei analytischen Gelen mit einer Wellenlänge von 280 nm, bei präparativen Gelen wurde zwecks geringerer Schädigung der Nukleinsäuren eine Wellenlänge von 360 nm verwendet.

III.1.12 Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA inmitten oder in der Nähe spezifischer, oft palindromischer Erkennungssequenzen. Die Spaltung geschieht dabei durch die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Je nach Enzym entstehen dabei entweder Fragmente mit einem 3'- bzw. 5'-Überhang (*sticky ends*) oder aber „glatte“ Enden ohne Überhang (*blunt ends*), welche anschließend mit den entsprechenden Enden anderer Fragmente wieder ligiert werden können. Standardmäßig wurden zwischen 1 und 5 µg zu verdauende DNA mit 1 µl Restriktionsenzym versetzt und in 20 bis 50 µl 1x Reaktionspuffer für 2 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DNA-Konzentration nicht 0,1 µg/ml und der Volumenanteil an Enzym nicht 10 % des Reaktionsansatzes überschreitet. Mehrfachreaktionen mit mehr als einem Restriktionsenzym wurden, wenn möglich, in einem Ansatz durchgeführt. War dies aufgrund unterschiedlicher Puffer-Anforderungen der verschiedenen Enzyme nicht möglich, wurde die DNA zwischen den Reaktionen gereinigt und ein erneuter Ansatz pipettiert. Nach abgeschlossener Reaktion wurden die Restriktionsenzyme, wenn möglich, hitzeinaktiviert oder die DNA gereinigt.

III.1.13 Auffüllen der 3'-Überhänge von DNA-Fragmenten nach enzymatischer Spaltung

Durch die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen erzeugte DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Enden lassen sich trotzdem miteinander ligieren, wenn man die entstandenen Überhänge auffüllt und somit so genannte *blunt ends* erzeugt. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I durchgeführt. Dieses besitzt die 5' → 3'-Polymerase- und die 3' → 5'-Exonukleaseaktivität der intakten DNA-Polymerase I, aber nicht die 5' → 3'-Exonukleaseaktivität des vollständigen Enzyms. Die Reaktion fand, sofern sich das zuvor verwendete

Restriktionsenzym hitzeinaktivieren ließ, direkt im Restriktionsansatz statt. Dafür wurde das Volumen mit nukleasefreiem Wasser auf das Doppelte des ursprünglichen Volumens aufgefüllt, zusätzlich 0,25 µl einer 100 mM dNTP-Lösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP in gleichen Anteilen), 10 U Klenow-Fragment (Bioline GmbH, Luckenwalde) und 1/20 des Reaktionsvolumens an 10x-Reaktionspuffer zugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min gestoppt. Erfolgte nach dem Schneiden der DNA mit einer Restriktionsendonuklease eine Klenow-Behandlung, wird dies in dieser Arbeit mit dem in Klammern gesetzten Zusatz „*blunt*“ gekennzeichnet.

III.1.14 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um zu verhindern, dass ein linearisierter Vektor in einem Ligationsansatz mit sich selbst ligiert, wurden die 5'-Enden mit Hilfe des Enzyms Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt/Main) dephosphoryliert. Dieses hat im Gegensatz zu alkalischer Phosphatase den Vorteil, dass es in nahezu allen herkömmlichen Restriktionsendonukleasepuffern aktiv ist, sich problemlos hitzeinaktivieren lässt und somit vor einer Ligation nicht aus dem Reaktionsansatz entfernt werden muss. In einer typischen Reaktion wurden zu einem Restriktionsansatz mit 1–5 µg Plasmid-DNA 1/10 Volumen 10x-Phosphatasepuffer und 5 U Antarctic Phosphatase zugegeben und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 5-minütiger Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C wurde der Vektor direkt für eine Ligation eingesetzt.

III.1.15 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen und ermöglicht somit die Ligation von DNA-Fragmenten in zuvor geschnittene Vektoren. Die Reaktion wurde in 10 µl-Ansätzen durchgeführt. Es wurden grundsätzlich mehrere Parallelansätze durchgeführt, in denen zu einer festen Menge an Plasmid-DNA (50–100 ng) unterschiedliche Mengen an Insert (3- bis 30-facher molarer Überschuss) gegeben wurde. Die Reaktionen enthielten zusätzlich 2 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 1 µl 10x-Reaktionspuffer und im Fall, dass Fragmente mit *blunt ends* ligiert werden sollten, zusätzlich 1 µl PEG (40 % (w/v) PEG 8000 in H₂O). Die

METHODEN

Reaktionen wurden für 16 Stunden bei 16 °C und weitere 2 Stunden bei RT inkubiert und anschließend direkt in eine Transformation eingesetzt.

III.1.16 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte wie in *Current Protocols in Molecular Biology* beschrieben (Ausubel, 1997). 4 ml einer *E. coli* ü.N.-Kultur wurden mit 400 ml 37 °C warmem LB-Medium verdünnt und unter Schütteln wachsen gelassen, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,375 erreichte. Die Zellen wurden in vorgekühlte, sterile 50 ml Zentrifugengefäße aliquotiert, für 10 min auf Eis gehalten und anschließend für 7 min bei 1600 g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und die Zellen vorsichtig in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (60 ml CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM PIPES, pH 7,0) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert (5 min, 1100 g, 4 °C) und in 10 ml frischer CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden für 12–24 Stunden auf Eis gehalten, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in einer Ethanol/Trockeneis-Mischung schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei –70 °C.

III.1.17 Transformation von *E. coli*

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli* langsam auf Eis aufgetaut, die DNA zugegeben (ca. 0,1 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz), kurz geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 sec (*E. coli* XL10-Gold®) bzw. 90 sec (*E. coli* DH5α) bei 42 °C wurden die Zellen für weitere 1–2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1 ml 37 °C warmes LB-Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden für 5 min bei 4000 g pelletiert, der Überstand bis auf 200 µl abgenommen, die Bakterien im restlichen Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag auf Kolonien überprüft

III.1.18 Kolonie-PCR

Zur schnellen Überprüfung einer großen Anzahl von Kolonien nach der Transformation eines Ligationsansatzes wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Sie sollte klären, welche der Kolonien das gewünschte Ligationsprodukt aufgenommen hatte. Hierfür wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 20 µl sterilem Wasser suspendiert. Anschließend wurde 1 µl der Suspension als Matrize in eine PCR eingesetzt. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass einer der beiden Primer im Vektor, der andere in der Sequenz des Inserts bindet. Auf diese Weise ergibt sich nur dann ein PCR-Produkt, wenn das Insert die gewünschte Orientierung aufweist. Die PCR wurde wie unter III.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug 29. Von positiven Kolonien wurde ein Teil der restlichen Zellsuspension auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und eine ü.N.-Kultur für eine Plasmidpräparation angeimpft. Das Ergebnis der Kolonie-PCR wurde anschließend mittels eines analytischen Restriktionsverdau und durch Sequenzierung überprüft.

III.1.19 DNA-Sequenzierung

Die verwendete Sequenzierungsmethode basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des *ABI PRISM ready reaction dye deoxy terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt) durch die zentrale Sequenzier-einrichtung des Robert Koch-Instituts durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt typischerweise 200–500 ng gereinigte Plasmid-DNA, 5 pmol Sequenzierprimer, 2 µl *Big Dye Ready Reaction Mix* und 2 µl 5x Reaktionspuffer in einem 10 µl Reaktionsansatz.

III.2 Zellbiologische Methoden

III.2.1 Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Gelatine

Pro cm² Wachstumsfläche wurden 0,1 ml Gelatinelösung (0,1 % (w/v) Gelatine, Sigma-Aldrich, München, in PBS) in das Zellkulturgefäß gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vollständig abgesaugt und das Zellkulturgefäß sofort verwendet.

III.2.2 Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Typ I-Kollagen

Pro cm² Wachstumsfläche wurden 0,1 ml einer 1:10 in sterilem Wasser verdünnten Kollagenlösung aus Kälberhaut (1 mg/ml Protein in 0,1M Essigsäure, Sigma-Aldrich, München) in das Zellkulturgefäß gegeben und ü.N. bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vollständig abgesaugt und die Gefäße unter einer Sterilbank stehen gelassen, bis sie vollständig getrocknet waren. Die so beschichteten Platten wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden sie 1-mal gründlich mit PBS gewaschen.

III.2.3 Kultivierung adhärenter Säugerzellen

III.2.3.1 Kultivierung undifferenzierter embryonaler Stammzellen der Maus

Undifferenzierte CGR8-ES-Zellen und ihre abgeleiteten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in gelatinisierten Zellkulturgefäßen in *Glasgow Minimum Essential Medium* (Sigma-Aldrich, München) mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat (PAA Laboratories, Österreich), 15 % (v/v) FCS (Lot-No.: 627EE, Biochrom AG, Berlin), 0,1 mM nicht essentiellen Aminosäuren (Sigma-Aldrich, München), 0,1 mM 2-Mercaptoethanol und 1000 U/ml *leukemia inhibitory factor* (ESGRO®; Chemicon, USA) kultiviert (ES-Medium). Typischerweise wurden 2·10⁴ Zellen/cm² ausgelegt. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach weiteren 24 Stunden subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und durch 3-minütige Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS; PAA Laboratories, Österreich) bei 37 °C von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in frischem ES-Medium aufgenommen, vorsichtig mit der Pipette vereinzelt, bei 500 g pelletiert, in ES-Medium resuspendiert und in einem frisch gelatinisierten Zellkulturgefäß ausgelegt.

III.2.3.2 Kultivierung von HepG2-, HuH-7-, 293- und BD EcoPack2™-293-Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Biochrom AG, Berlin) mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und

10 % (v/v) FCS (PAA Laboratories, Österreich) kultiviert. Im Falle der EcoPack2™-293-Zellen wurde zusätzlich 1 mM Natriumpyruvat (PAA Laboratories, Österreich) und 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (Sigma-Aldrich, München) zum Medium gegeben. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend durch Trypsinierung abgelöst und subkultiviert (siehe oben). Der Verdünnungsfaktor war abhängig von der jeweiligen Zelllinie und betrug zwischen 1:3 und 1:10.

III.2.3.3 Kultivierung von NIH3T3-Zellen

Die Kultivierung der NIH3T3-Zellen erfolgte wie unter III.2.3.2 beschrieben, allerdings wurde dem Medium 10 % (v/v) NCS (Biochrom AG, Berlin) anstatt FCS zugegeben.

III.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung von Säugerzellen erfolgte im entsprechenden Wachstumsmedium mit 20 % (v/v) Serum und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid, bei -80 °C für einige Wochen oder in der Gasphase über flüssigem Stickstoff für längere Zeiträume. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Abkühlgeschwindigkeit beim Einfrieren $\leq 1\text{ °C/min}$ lag.

III.2.5 Alkalische Phosphatase-Färbung von ES-Zellen

Ein Merkmal undifferenzierter ES-Zellen ist die starke Expression Alkalischer Phosphatase (AP) (Wobus et al., 1984; Pease et al., 1990). Sie kann somit als ein schnell zu überprüfender Marker für den Differenzierungszustand einer ES-Zell-Kultur verwendet werden.

Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 1-mal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit eiskaltem Ethanol fixiert, mit AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9,5) gewaschen und anschließend für 15 min in frisch angesetzter AP-Färbelösung (je 66 µl NBT- und BCIP-Lösung, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, in 10 ml AP-Puffer) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Färbelösung und Waschen mit Wasser gestoppt und die Färbung der Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

III.2.6 Produktion rekombinanter Moloney-Maus-Leukämie-Viren

Die Produktion rekombinanter Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV)-Partikel erfolgte in BD EcoPack2™-293-Zellen. Dafür wurden $7,5 \cdot 10^6$ Zellen/10 cm-Schale ausgelegt und am folgenden Tag mit 5 µg retroviralem Expressionsvektor wie unter III.2.9.1 beschrieben transfiziert. Nach 8 Stunden wurde das Transfektionsgemisch von den Zellen entfernt und durch 12 ml neues Wachstumsmedium ersetzt. Die Ernte der Viren erfolgte in der Regel nach weiteren 40 Stunden (48 h-Überstand). Dafür wurde das Medium mit einer Pipette abgesaugt und durch Filtration mit einem 0,45 µm Zelluloseacetat-Filter (Schleicher & Schuell/Whatman GmbH, Dassel) von Zellresten gereinigt. Die Zellen wurden anschließend erneut für 24 Stunden mit 12 ml frischem Wachstumsmedium inkubiert und ein zweites Mal Virus geerntet. Die virushaltigen Überstände wurden, wenn möglich, sofort weiterverwendet oder aber bei -80 °C ohne die Zugabe von Zusätzen weggefroren.

III.2.7 Polyethylenglykol-Fällung rekombinanter MMLV-Partikel

Pro 10 ml virushaltigem Medium wurde 1 ml einer 5 M NaCl-Lösung und 4 ml gekühlte Polyethylenglykol (PEG)-Lösung (31,875 % (w/v) PEG 6000 in H_2O) langsam und unter ständigem Rühren auf Eis zugegeben. Anschließend wurde für 1,5 Stunden bei 4 °C vorsichtig gerührt. Es folgte eine Zentrifugation bei 7000 g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die pelletierten Viren in 1 % des ursprünglichen Volumens an frischem Medium resuspendiert. Die Viren wurden im Anschluss sofort für die Infektion von Zellen verwendet.

III.2.8 Bestimmung des Titers infektiöser MMLV-Partikel

Die Bestimmung des Titers infektiöser MMLV-Partikel erfolgte durch Infektion von NIH3T3-Zellen. Dazu wurden am Vortag $1 \cdot 10^5$ Zellen/6 cm-Zellkulturschale in 3 ml Wachstumsmedium ausgelegt. Die virushaltigen Überstände (bzw. gefällten Viren) wurden um den Faktor 10 bis 10^6 mit frischem Wachstumsmedium verdünnt und je eine Schale mit 1 ml einer Verdünnungsstufe wie unter III.2.9.2 beschrieben infiziert.

Im Falle der konstitutiv exprimierenden Konstrukte pQCeCFPIP und pQCAGeCFPIP wurde 24 Stunden nach der Infektion das Medium durch frisches Wachstumsmedium ersetzt und weitere 24–48 Stunden später infizierte Kolonien unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Im Falle der Konstrukte, welche die Fluoreszenzproteine unter der Kontrolle spezifischer Promotoren exprimieren, wurde das Medium nach 24 Stunden durch Selektionsmedium ersetzt (100 µg/ml Zeocin, Invivogen, USA) und im Weiteren alle 48 Stunden gewechselt. Nach 10 bis 12 Tagen wurden resistente Kolonien unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

III.2.9 Transfektion

III.2.9.1 Polymer-basierte Transfektion

Die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des Polymer-basierten Transfektionsreagenzes ExGen 500 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Dabei handelt es sich um eine sterile Lösung von linearen Polyethylenimin-Molekülen (22kDa) in Wasser. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

III.2.9.2 Infektion mit rekombinanten MMLV-Partikeln

Für die Infektion von NIH3T3-Zellen wurden die Zellen am Vortag mit einer Dichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen/cm² ausgelegt. Die Infektion erfolgte in der Regel über Nacht in Wachstumsmedium mit 4 µg/ml Polybren (Sigma-Aldrich, München).

Für die Infektion von ES-Zellen wurden am Vortag $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in gelatinisierten 35 mm-Zellkulturschalen ausgelegt. Für die Infektion wurden bis zu 1,5 ml gefällte und in ES-Medium resuspendierte Viren eingesetzt. Die Infektion erfolgte für 2 Stunden mit 8 µg/ml Polybren. Im Anschluss wurde das Medium durch frisches ES-Medium ersetzt.

III.2.9.3 Elektroporation von ES-Zellen

Eine subkonfluente Kultur von ES-Zellen wurde trypsiniert, vereinzelt und in ES-Medium resuspendiert. Pro Elektroporationsansatz wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen in ein steriles Zentrifugenröhrchen

METHODEN

überführt und zuerst zweimal mit je 10 ml eiskaltem PBS und anschließend einmal mit 10 ml eiskaltem Elektroporationspuffer (EP-Puffer; 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM Glukose, 0,7 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, pH 7,0) gewaschen und schließlich in 700 µl EP-Puffer resuspendiert. Es wurde ca. 100 µg linearisierter, gereinigter Vektor zugegeben, vorsichtig gemischt, die Zellen in eine 4 mm-Elektroporationsküvette überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 240 V, 500 µF mit einem GenPulser II (Bio-Rad Laboratories, USA). Die Zellen wurden erneut für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend in warmem ES-Medium resuspendiert und auf drei gelatinisierten 10 cm-Zellkulturschalen ausgelegt.

III.2.10 Selektion stabil transfizierter ES-Zellklone

24 Stunden nach Transfektion wurden die ES-Zellen wie unter III.2.3.1 beschrieben passagiert und das Medium durch ein Selektionsmedium ersetzt (20 µg/ml Zeocin in ES-Medium, Invivogen, USA). Das Medium wurde im Anschluss mindestens alle 48 Stunden durch neues Selektionsmedium ersetzt, bis nach 10 bis 14 Tagen resistente Kolonien mit dem bloßen Auge sichtbar waren. Die Zellen wurden 1-mal mit PBS gewaschen. Morphologisch einwandfreie Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze abgeschabt, in 25 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS; PAA Laboratories, Österreich) überführt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausblasen mit der Pipette in 250 µl Selektionsmedium vereinzelt und in ein Well einer zuvor gelatinisierten 48-Well-Platte ausgelegt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen auf je ein Well zweier 24-Well-Platten passagiert und die Zeocin-Konzentration im Medium auf 10 µg/ml reduziert. Eine Platte diente der Weiterzucht der Zellen. Aus den Zellen der anderen Platte wurde genomische DNA isoliert, um die Klone auf die Integration der gewünschten Sequenzen hin zu überprüfen. Um eine klonale Abstammung zu gewährleisten, wurden relevante Klone verdünnt und aus einer einzelnen Zelle erneut hochgezogen.

III.2.11 Genotypisierung selektionierter Zellklone

Die Genotypisierung nach Transfektion selektionierter Klone erfolgte mittels PCR. Da die transfizierte DNA keinerlei Elemente trug, die eine extrachromosomale Replikation in

eukaryotischen Zellen ermöglichen, konnte davon ausgegangen werden, dass nach der Selektion nachweisbare Sequenzen in das Genom integriert wurden. Dabei wurde nach viraler Transfektion ebenfalls davon ausgegangen, dass nach einer erfolgreichen Infektion der Zellen und einer Expression des Resistenzgens die gesamte zwischen den LTRs gelegene Sequenz integriert wurde. In diesem Fall wurde die Integration der gewünschten Sequenzen ausschließlich über den Nachweis der für die Fluoreszenzproteine kodierenden Sequenzen überprüft. Im Falle der durch Elektroporation der pROSA26-1-Konstrukte erzeugten Zellklone kann es trotz der Negatiselektion durch das Diferie-Toxin A-Genfragment auch zur Selektion durch nicht-homologe Rekombinationsereignisse entstandener Klone kommen. In diesem Falle ist es möglich, dass trotz eines positiven Nachweises der für die Fluoreszenzproteine kodierenden Sequenzen entscheidende regulatorische Elemente der vorangeschalteten Promotor-/Enhancer-Bereiche nicht in das Genom der Zellen integriert wurden. Aus diesem Grund wurde eine zweite PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, welches zum einen im Bereich des ROSA26-Lokuses, zum anderen in der zu integrierenden Sequenz band. Über die Größe des erhaltenen Produkts konnte so eine Aussage darüber gemacht werden, ob der gesamte Bereich integriert wurde. Um die Integrität der genomischen DNA sicherzustellen, wurde als Kontrolle zusätzlich eine PCR mit Primern durchgeführt, die in der Sequenz des β -Tubulin-Gens banden. Die für die einzelnen Sequenzen verwendeten Primerpaare und *Annealing*-Temperaturen können aus Tabelle 6 entnommen werden. Die zugehörigen Sequenzen sind unter Abschnitt II.6 angegeben. Die PCR wurde wie unter III.1.1 beschrieben durchgeführt. Es wurde etwa 0,5–1 μ g genomische DNA als Matrize eingesetzt. Die Anzahl der Zyklen betrug 34.

Tabelle 6: Verwendete Primerpaare zum Nachweis der integrierten Sequenzen

Nachzuweisende Sequenz	Verwendetes Primerpaar
nucGFP	nucGFP_FW_G / nucGFP_BW_G
DsRed2	DsRed2_FW_G / DsRed2_BW_G
eCFP	EXFP_FW_G / EXFP_BW_G
TTR-Promotor/Enhancer	TTRPr_BW_G / pROSA_BW
ALB-Promotor/Enhancer	pROSA_FW / 2335A1-RSeq
G6Pase-Promotor	G6Pr_BW_Not / pROSA_BW
β -Tubulin	b.tub_FW / b.tub_BW

III.2.12 Differenzierung der ES-Zellen zu Hepatozyten

III.2.12.1 Differenzierung in *embryoid bodies*

Die Differenzierung muriner ES-Zellen zu Hepatozyten in *embryoid bodies* (EBs) erfolgte in Anlehnung an das 2001 von Hamazaki et al. publizierte Protokoll (Hamazaki et al., 2001). Wenn nicht anders angegeben, wurden hierfür frisch trypsinierte ES-Zellen einmal mit PBS gewaschen und in *Iscove's Basal Medium* (Biochrom AG, Berlin) mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Österreich), 300 μ M Monothioglycerol (Sigma-Aldrich, München) und 20 % (v/v) FCS (Biochrom AG, Berlin) resuspendiert (Differenzierungsmedium) und auf $3,75 \cdot 10^4$ Zellen/ml verdünnt (Tag 0). Anschließend wurden je 20 μ l der Zellsuspension als Tropfen an die Unterseite des Deckels einer mit PBS gefüllten Zellkulturschale pipettiert (entspricht 750 Zellen pro Tropfen) und für 2 Tage im Zellkulturbrutschrank inkubiert (Abbildung 9).

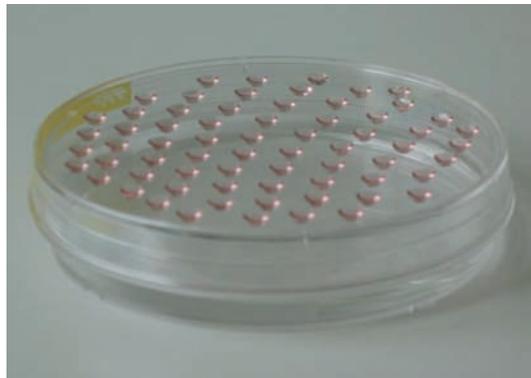


Abbildung 9: Kultivierung von Zellen mit der *hanging drop*-Methode

Die in den Tropfen entstanden EBs wurden geerntet und für weitere 3 Tage in unbehandelten Kunststoff-Petrischalen kultiviert, um ein Anhaften am Boden zu verhindern. An Tag 5 wurden die EBs auf mit Kollagen Typ I beschichteten Zellkulturschalen ausgelegt (ca. 1 EB/cm² Wachstumsfläche) und für den Rest des Differenzierungsprozesses das Medium spätestens alle zwei Tage gewechselt. Um eine Differenzierung der Zellen zu reifen Hepatozyten zu stimulieren, wurden dem Medium zu unterschiedlichen Zeiten spezifische Wachstumsfaktoren zugesetzt. Dabei handelte es sich, wenn nicht abweichend beschrieben, um 100 μ g/ml FGF-1 von Tag 2–10, 20 ng/ml HGF von

Tag 10–18 (tebu-Bio, Offenbach) und 10 ng/ml Oncostatin M, 10^{-7} M Dexamethason und ITS-Supplement (5 μ g/ml Insulin, 5 μ g/ml Transferrin und 5 ng/ml Selenensäure) von Tag 15–18 (Sigma-Aldrich, München). In einigen Experimenten wurde zusätzlich 20 ng/ml FGF-4 (tebu-Bio, Offenbach) oder synthetischer Serumersatz (Biochrom AG, Berlin) zugegeben.

III.2.12.2 Differenzierung in *Monolayer*-Kultur

Die Differenzierung muriner ES-Zellen zu Hepatozyten-Vorläufern in *Monolayer*-Kultur erfolgte in verkürzter und leicht veränderter Weise nach dem Protokoll veröffentlicht von Teratani und Koautoren im Jahr 2005 (Teratani et al., 2005). ES-Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, für 3 Tage auf gelatinisierten Platten in ES-Medium ohne LIF mit 10^{-8} M all-*trans*-Retinsäure kultiviert. Die Zellen wurden passagiert und mit einer Dichte von $5 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in ES-Medium ohne LIF auf kollagenisierten Platten ausgelegt. Zum Medium wurde 100 ng/ml FGF-1 (aFGF), 20 ng/ml FGF-4 und 50 ng/ml HGF (tebu-bio, Offenbach) zugegeben und die Zellen für 5 Tage unter diesen Bedingungen gezogen. Dabei wurde das Medium spätestens alle 2 Tage durch frisches Medium mit Faktoren ersetzt. An Tag 8 wurden die Faktoren durch 10 ng/ml Oncostatin M ersetzt und die Zellen für weitere zwei Tage kultiviert.

III.2.13 Fixierung von Zellen

Zellen in *Monolayer*-Kultur wurden zuerst für 30 min mit 4 % (w/v) Formaldehyd in PBS bei RT und anschließend für 10 min mit eiskaltem Ethanol (100 %) fixiert. Die Formaldehyd-Fixierung von EBs erfolgte aufgrund ihrer Größe für mindestens 60 min bei 4 °C. Die anschließende Ethanol-Fixierung erfolgte wie oben beschrieben.

III.3 Immunologische Methoden

III.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Sollte die Expression von Genen durch Detektion ihrer Genprodukte auf Zellebene untersucht werden, wurde die Synthese der entsprechenden Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz-

METHODEN

färbung untersucht. Hierfür wurden die Zellen (bzw. *embryoid bodies*) auf, wenn nötig, beschichteten Deckgläschen (CARL ROTH, Karlsruhe) in 24-Well-Platten ausgelegt. Die Zellen wurden wie unter III.2.13 beschrieben fixiert, dreimal für 10 min mit PBS-T (0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS) gewaschen und für 45 min mit Rinderserumalbumin (10 % (w/v) BSA Fraktion V in PBS-T; PAA Laboratories, Österreich,) bei RT blockiert. Die Inkubation der Zellen mit den spezifischen primären Antikörpern erfolgte ebenfalls in 10 % (w/v) BSA in PBS-T (2 h bei RT bzw. ü.N. bei 4 °C). Die Detektion gebundener Primärantikörper erfolgte mittels speziesspezifischer, fluorophorgekoppelter Sekundärantikörper für 2 h bei RT in 10 % (w/v) BSA in PBS-T. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurden die Zellen fünfmal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (Sigma-Aldrich, München) bzw. Toto-3 (Molecular Probes, USA). DAPI wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml während der Fixierung mit eiskaltem Ethanol, Toto-3 in einer Konzentration von 2 µM während der Inkubation der Zellen mit sekundären Antikörpern zugegeben.

III.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Detektion der Fluoreszenzproteine bzw. durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung angefarbter Proteine erfolgte entweder an einem Leitz DM RBE-Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) oder an einem LSM510 META konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss, Jena). Die am LSM 510 META zur Anregung bzw. Detektion der einzelnen Fluorophore und Fluoreszenzproteine verwendeten Wellenlängen sind aus Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Anregung und Detektion der verschiedenen Fluorophore/Fluoreszenzproteine am LSM 510 META

Fluorophor /Fluoreszenzprotein	Anregungswellenlänge	Detektion
FITC	488 nm	509 nm – 552 nm
Cy ³ ™	543 nm	560 nm – 650 nm
Cy ⁵ ™	633 nm	649 nm – 745 nm
Toto-3	633 nm	649 nm – 745 nm
nucGFP	488 nm	505 nm – 550 nm
eCFP	458 nm	467 nm – 499 nm
DsRed2	543 nm	563 nm – 627 nm

III.3.3 Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung der Synthese der Fluoreszenzproteine in differenzierten ES-Zellen kam auch die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) zum Einsatz. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 5 min. mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS, PAA Laboratories, Österreich) bei 37 °C von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst und die Reaktion anschließend mit 10 % (v/v) FCS in PBS abgestoppt. Um die Zellen vollständig zu vereinzeln, wurden sie anschließend mit einer Spritze mehrmals durch eine Ø 0,9 mm-Nadel gezogen, sedimentiert und in kaltem PBS aufgenommen. Die Messung erfolgte an einem FACSCalibur der Firma BD Bioscience (USA), die Auswertung der Daten mit Hilfe der Software CellQuest Pro (ebenfalls BD Bioscience).

IV Ergebnisse

IV.1 Etablierung einer von Feeder-Zellen unabhängigen ES-Zellkultur – Überprüfung unterschiedlicher Chargen fetalen Kälberserums

Das Wachstum und der Differenzierungszustand von ES-Zellen sind stark abhängig von der verwendeten Charge an fetalem Kälberserum (FCS). Dies gilt vor allem für ES-Zellen, welche unter *feeder*-freien Bedingungen kultiviert werden. Um für weitere Versuche optimale Ausgangsbedingungen zu schaffen, ist es deshalb wichtig, eine geeignete FCS-Charge zu finden. Aus diesem Grund wurden FCS-Präparationen unterschiedlicher Hersteller und Chargen auf ihre Fähigkeit getestet, das Wachstum undifferenzierter ES-Zellen zu fördern. Hierfür wurden frische Zellen aufgetaut und bei geringer Dichte (ca. $2,5 \cdot 10^3$ Zellen/cm²) in Medien mit unterschiedlichen FCS-Chargen ausgelegt. Nach 7 Tagen wurden die Kulturen unter dem Mikroskop ausgewertet und anhand der Anzahl, Größe und Morphologie der entstandenen Kolonien bewertet. Undifferenzierte ES-Zellen zeigen dabei kompakte Kolonien mit scharfen Rändern (Abbildung 10).

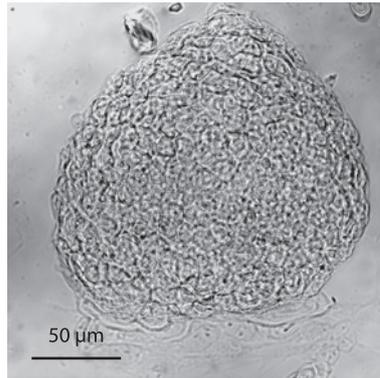


Abbildung 10: Kolonie undifferenzierter ES-Zellen

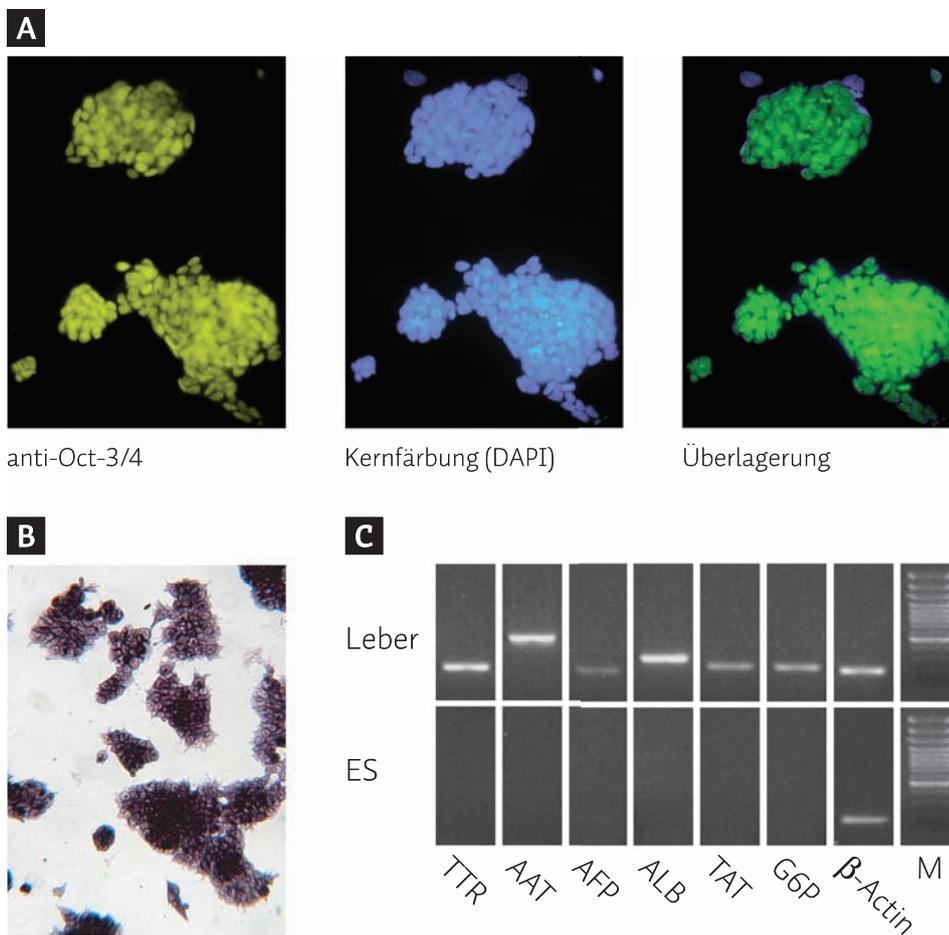


Abbildung 11: Differenzierungszustand der ES-Zellkultur. CGR8-ES-Zellen wurden für mehrere Passagen in Medium mit der Serumcharge 627EE der Firma Biochrom AG kultiviert. **A** Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf Oct-3/4. Nach 4 Passagen wurden Zellen auf Objektträgern ausgelegt, fixiert und die Kerne mittels DAPI gefärbt. Es erfolgte eine Markierung Oct-3/4-positiver Zellen mit einem Maus-anti-Oct-4-Antikörper und einem Cy³-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG als Sekundärantikörper (gelb). Die Überlagerung beider Signale (grün) zeigt eine fast vollständige Deckung. **B** Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität nach klonaler Subkultivierung (Passage 20). Ein Großteil der Zellen zeigt eine hohe Enzymaktivität und wird von der NBT/BCIP-Lösung angefärbt (violetter Niederschlag). **C** RT-PCR zur Überprüfung der Expression entodermaler (TTR, AAT) und leberspezifischer (AFP, ALB, G6P, TAT) Markergene. Die PCR liefert kein Signal mit der cDNA aus den ES-Zellen. Als Positivkontrolle diente cDNA aus Lebergewebe einer adulten Maus.

Zellen, die unter Verwendung der Serumcharge 627EE der Firma Biochrom AG kultiviert wurden, zeigten dabei die größte Anzahl morphologisch einwandfreier Kolonien.

Zur Klärung, ob die gewählte Serumpräparation eine Kultivierung undifferenzierter ES-Zellen über mehrere Passagen hinweg ermöglicht, wurde zu späteren Zeitpunkten eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf Oct-3/4 (Abbildung 11A) bzw. eine Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität (Abbildung 11B) durchgeführt. Sowohl die Synthese von Oct-3/4 (Scholer et al., 1989) als auch eine hohe alkalische Phosphatase-Aktivität (Wobus et al., 1984; Pease et al., 1990) sind Marker für pluripotente ES-Zellen. Beide Verfahren zeigten einen sehr hohen Anteil undifferenzierter Zellen in den Kulturen. Auch eine Überprüfung der Expression der differenzierungsspezifischen Markergene für Transthyretin (TTR) und α -1-Antitrypsin (AAT) als entodermale Marker, für α -Fetoprotein (AFP) und Albumin (ALB) als frühe leberspezifische Marker sowie Glukose-6-Phosphatase (G6P) und Tyrosinaminotransferase (TAT) als späte Lebermarker zeigt in der RT-PCR in Übereinstimmung dazu negative Ergebnisse (Abbildung 11C).

IV.2 Etablierung und Optimierung von Differenzierungsprotokollen

IV.2.1 Differenzierung in *embryoid bodies*

IV.2.1.1 Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe der verschiedenen Wachstumsfaktoren

Hamazaki und Koautoren setzen ihrem System verschiedene Faktoren zu, um eine Differenzierung der Zellen zu Hepatozyten zu erreichen (Hamazaki et al., 2001). FGF-1 soll zwischen Tag 9 und 12 eine Spezifizierung der Zellen entlang der hepatischen Linie unterstützen. HGF soll ab Tag 12 die Proliferation der Hepatoblasten fördern, während OSM, Dexamethason und ITS-Supplement ab Tag 15 zu einer Reifung der Hepatozyten führen sollen (siehe I.4.1, Abbildung 7).

Betrachtet man unterschiedliche Veröffentlichungen miteinander vergleichbarer *in vitro*-Differenzierungsprotokolle, so zeigt sich, dass das Auftreten der Expression verschiedener Differenzierungsmarker zeitlich oft stark variiert. Verantwortlich hierfür wird neben möglichen Unterschieden in den Kultivierungsbedingungen der undifferenzierten ES-Zellen oft die verwendete Zelllinie gemacht. Um die Bedingungen des Differenzierungsprotokolls und die Zeitpunkte der Zugabe der

einzelnen Faktoren optimal auf die verwendeten CGR8-ES Zellen abzustimmen, wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt die Expression leberspezifischer Markergene erstmals nachzuweisen ist. Dafür wurden die Zellen wie unter III.2.12.1 beschrieben kultiviert. Eine Zugabe externer Faktoren fand nicht statt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels RT-PCR die Expression spezifischer Markergene analysiert. Bereits an Tag 8 kann eine Expression der leberspezifischen Markergene für α -Fetoprotein und Albumin nachgewiesen werden, die bis Tag 18 stark zunimmt (Abbildung 12). Eine Expression der späten Markergene für Glukose-6-Phosphatase bzw. Tyrosinaminotransferase wird unter diesen Bedingungen zu keinem Zeitpunkt detektiert. Undifferenzierte ES-Zellen zeigen keine Expression dieser Markergene.

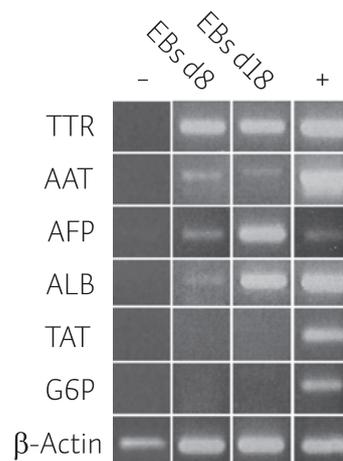


Abbildung 12: Markergenexpression in differenzierenden CGR8-ES-Zellen ohne die Zugabe externer Faktoren. CGR8-Zellen wurden wie unter III.2.12.1 kultiviert, eine Zugabe externer Faktoren fand jedoch nicht statt. An Tag 8 (EBs d8) bzw. nach Beendigung des Differenzierungsprotokolls (EBs d18) wurde RNA isoliert und eine RT-PCR auf die Expression differenzierungsstadienspezifischer Markergene durchgeführt. Bereits an Tag 8 ist die Expression leberspezifischer Markergene (AFP, ALB) nachzuweisen. Die Expression nimmt bis Tag 18 stark zu. Die Expression später Marker (TAT, G6P) konnte zu keinem Zeitpunkt gezeigt werden. (-): RNA aus undifferenzierten ES-Zellen; (+): RNA aus der Leber einer adulten Maus.

Es kommt somit schon vor dem 8. Tag zu einer Determinierung von Zellen in Richtung Hepatozyten. Deshalb wurde untersucht, ob eine frühere Zugabe von FGF-1 und eine ebenfalls vorgezogene Gabe von HGF einen positiven Einfluss auf die Expression leberspezifischer Markergene haben. Hierfür wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt: Bei Ansatz 1 wurde FGF-1 von Tag 2–10 und HGF ab Tag 10 des Differenzierungsprotokolls zugegeben. Bei Ansatz 2 erfolgte die Faktorenzugabe wie im Originalprotokoll von Hamazaki und Koautoren beschrieben (FGF-1 von Tag 9–12, HGF ab Tag 12). Nach Beendigung der Differenzierungsprotokolle (Tag 18) wurde RNA isoliert und die Expression spezifischer Markergene mittels RT-PCR untersucht. Es zeigte

ERGEBNISSE

sich, dass unter den veränderten Bedingungen alle untersuchten Gene stärker exprimiert werden (Abbildung 13). Vor allem die leberspezifischen Gene für Albumin und Glukose-6-Phosphatase zeigen eine deutlich gesteigerte Expression, die Steigerung der *Tat*-Expression wiederum ist kaum darzustellen. Selbst die Gene der frühen entodermalen Marker Transthyretin (TTR) und α -1-Antitrypsin (AAT), welche jedoch ebenfalls in der adulten Leber gebildet werden, zeigen ein erhöhtes Expressionslevel.

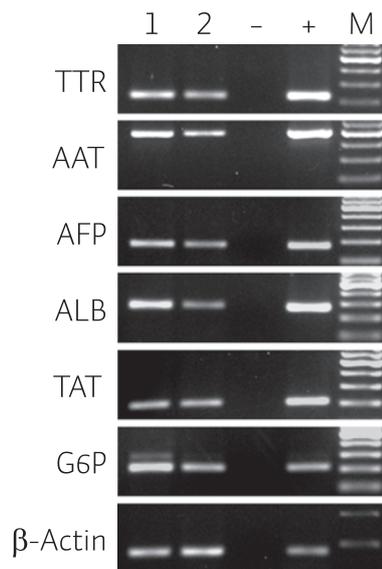


Abbildung 13: Einfluss des Zeitpunktes der Faktorengabe auf den Differenzierungsprozess. Gezeigt ist die Expression entodermaler (TTR, AAT) sowie früher (AFP, ALB) und später (TAT, G6P) leberspezifischer Gene nach Veränderung des zeitlichen Ablaufs der Faktorengabe (FGF-1 von Tag 2–10, HGF von Tag 10–18; Spur **1**) und nach Abschluss des Original-Differenzierungsprotokolls (FGF-1 von Tag 9–12, HGF von Tag 12–18; Spur **2**). Eine vorgezogene Zugabe von FGF-1 und HGF führt zu einer gesteigerten Expression aller überprüften Gene. Als Negativkontrolle (-) dienten undifferenzierte ES-Zellen, als Positivkontrolle (+) Lebergewebe einer adulten Maus. **M**: DNA-Größenstandard.

IV.2.1.2 Einfluss von FGF-4 auf die Differenzierung zu hepatozellulären Vorläufer

FGF-4 unterstützt neben FGF-1 und HGF die Bildung Albumin-positiver Zellen aus murinen ES-Zellen in *Monolayer*-Kultur (Teratani et al., 2005). Es ist somit denkbar, dass FGF-4 auch *in vivo* an der Spezifizierung hepatischer Vorläuferzellen beteiligt ist. Um zu überprüfen, ob FGF-4 auch bei der EB-basierten *in vitro*-Differenzierung zu hepatozytenähnlichen Zellen einen positiven Effekt besitzt, wurde zum ungefähren Zeitpunkt der Spezifizierung (d5–10) dem Differenzierungsmedium in einem parallelen Ansatz neben FGF-1 auch FGF-4 zugesetzt. An Tag 10 des Differenzierungs-

protokolls wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels RT-PCR die Expression des Albumingens untersucht. Der zusätzliche Einsatz von FGF-4 führt dabei zu einer vergleichsweise geringeren *Alb*-Expression als bei alleiniger Gabe von FGF-1 (Abbildung 14).

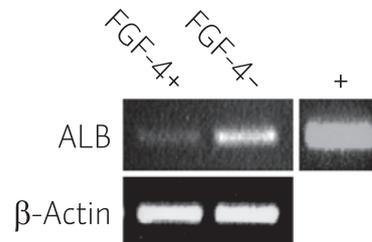


Abbildung 14: Einfluss von FGF-4 auf die Entstehung Albumin-positiver Zellen. Die Zellen wurden wie unter III.2.12.1 beschrieben kultiviert. Von Tag 5–10 wurde dem Differenzierungsmedium FGF-1 und FGF-4 (FGF-4+) bzw. nur FGF-1 (FGF-4-) zugesetzt. An Tag 10 wurde die Expression des Albumingens mittels RT-PCR überprüft. Die gleichzeitige Gabe von FGF-4 und FGF-1 führt zu einer verminderten Expression verglichen mit der alleinigen Zusetzung von FGF-1 zum Differenzierungsmedium. Als Positivkontrolle (+) diente Lebergewebe einer adulten Maus.

IV.2.1.3 Einfluss des Serums auf den Differenzierungsprozess

IV.2.1.3.1 Einfluss eines zeitlich begrenzten Serumentzugs auf die Entstehung Albumin-positiver Zellen

Kubo et al. zeigten 2004, dass ein zeitlich begrenzter Serumentzug die Entstehung entodermaler Zellen in EBs fördern und so zu einer gesteigerten Differenzierung entlang der hepatischen Linie führen kann (Kubo et al., 2004). Um zu überprüfen, ob diese Methode auch zu einer verbesserten Effizienz des hier etablierten Differenzierungsprotokolls führen könnte, wurden die Zellen wie beschrieben zwischen Tag 2,5 und Tag 6 der Differenzierung unter serumfreien Bedingungen gehalten. Der anstelle des Serums eingesetzte synthetische Serumersatz wurde in der doppelten Konzentration verwendet wie vom Hersteller angegeben, um ein vergleichbares Wachstum der EBs zu erreichen. Die Zugabe von FGF-1 zum Differenzierungsmedium erfolgte erst nach erneuter Serumgabe an Tag 6. An Tag 10 wurde die RNA isoliert und mittels RT-PCR das Expressionslevel des Albumingens untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die während der gesamten Zeit dem Einfluss von Serum ausgesetzt waren. Entgegen der von Kubo *et al.* beschriebenen Effekte führt der Serumentzug zu einer erheblich reduzierten Expression des Albumingens (Abbildung 15).

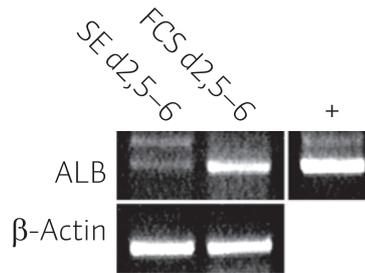


Abbildung 15: Einfluss eines zeitlich begrenzten Serumentzugs auf die Expression von Albumin in differenzierenden ES-Zellen. Die Zellen wurden zwischen Tag 2,5 und Tag 6 ihrer Differenzierung in EBs in Anwesenheit von Serum (FCS d_{2,5-6}) bzw. Serumentsatz (SE d_{2,5-6}) kultiviert. An Tag 10 des Differenzierungsprotokolls wurde die RNA isoliert und eine RT-PCR mit *Alb*-spezifischen Primern durchgeführt. Der Serumentzug führt zu einer deutlich verringerten Expression des Albumingens.

IV.2.1.3.2 Einfluss des verwendeten Kälberserums auf die Expression entwicklungsspezifischer Differenzierungsmarker

Das bei der Kultivierung eukaryotischer Zellen häufig eingesetzte Kälberserum enthält eine Vielzahl schlecht definierter Bestandteile, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, deren Zusammensetzung und Konzentrationen zwischen einzelnen Präparationen oft stark variiert. Um etwas über die Rolle des verwendeten Kälberserums für den Differenzierungsprozess und mögliche Unterschiede verschiedener Serumchargen zu erfahren, wurde das Differenzierungsprotokoll mit einer zweiten Präparation fetalen Kälberserums durchgeführt. Um dabei möglichst definierte Bedingungen zu schaffen, wurde eine standardisierte Serumpräparation gewählt, die durch Separation der Proteinbestandteile und anschließende definierte Rekonstitution der Fraktionen hergestellt wird (FCS-GOLD, PAA Laboratories, Österreich). Dadurch wird eine chargenunabhängige Zusammensetzung erreicht.

Der Einsatz dieser Serumpräparation führt zu einem drastischen Rückgang leberspezifischer Genexpression nach Beendigung des Differenzierungsprotokolls (Abbildung 16). Auch ist eine deutliche Änderung in der Menge entodermaler RNA-Spezies die Folge. Interessanterweise ist dabei die Expression des α -1-Antitrypsin-Gens stark verringert, die Menge an Transthyretin-RNA jedoch deutlich erhöht. Der beobachtete Rückgang der leberspezifischen Genexpression geht mit einem verzögerten Auftreten von Kardiomyozyten in den differenzierenden Kulturen einher. Während bei der standardmäßig verwendeten FCS-Charge an Tag 9 bereits 100 % der ausgelegten EBs Bereiche mit spontan kontrahierenden Zellen aufweisen, sind unter den geänderten Serumbedingungen zu diesem Zeitpunkt noch keine zu erkennen. Zwar kommt es ca. ab Tag 12 auch hier zu einer

langsamen Zunahme von Kardiomyozyten-Vorläufern, jedoch bleiben auch bis zum Abschluss des Differenzierungsprotokolls eine Reihe der EBs negativ.

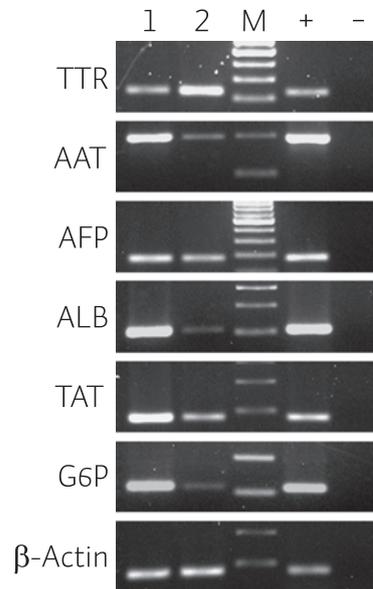


Abbildung 16: Einfluss des verwendeten Kälberserums auf die Expression entwicklungsspezifischer Differenzierungsmarker. CGR8-ES-Zellen wurden wie unter III.2.12.1 beschrieben kultiviert, um eine Differenzierung zu Hepatozyten zu erreichen. In parallelen Ansätzen wurden zwei unterschiedliche Serumpräparationen für die Herstellung des Differenzierungsmediums verwendet. Nach Beendigung des Differenzierungsprotokolls an Tag 18 wurde die RNA isoliert und die Expression differenzierungsstadienspezifischer Gene mittels RT-PCR untersucht. Der Einsatz einer durch Separation der Proteinbestandteile und anschließende definierte Rekonstitution der Fraktionen hergestellten standardisierten Serumpräparation (FCS-GOLD, PAA Laboratories, Österreich; Spur 2) führt verglichen mit der üblicherweise verwendeten FCS-Charge (Biochrom AG, Berlin; Spur 1) zu einem starken Rückgang der Expression sämtlicher Differenzierungsmarker mit Ausnahme des TTR-Gens. Als Negativkontrolle (-) dienen undifferenzierte ES-Zellen, als Positivkontrolle (+) Lebergewebe einer adulten Maus. **M**: DNA-Größenstandard.

Auch nach der Geburt kommt es in der Leber noch zu einer weiteren Reifung der Hepatozyten und zu deutlichen Änderungen in ihrem Expressionsmuster (Nemeth, 1954; Burch, 1963; Burch et al., 1963; Greengard, 1969; Greengard et al., 1972; Panduro et al., 1987). Da gezeigt werden konnte, dass Bestandteile des eingesetzten Kälberserums einen nicht unerheblichen Einfluss auf den Differenzierungsprozess besitzen, wurde versucht, durch die Verwendung eines aus neugeborenen Kälbern gewonnenen Serums (*newborn calf serum*, NCS) eine zusätzliche Reifung der generierten Hepatozyten zu erreichen. Hierfür wurden die Zellen nach Beendigung des regulären Differenzierungsprotokolls für weitere vier Tage in Anwesenheit von Faktoren (HGF, OSM, DEX, ITS) kultiviert. In einem parallelen Ansatz wurde das im Differenzierungsmedium standardmäßig verwendete FCS durch NCS ersetzt. Im Anschluss wurde die Expression des Glukose-6-Phosphatase-Gens als später Differenzierungsmarker untersucht.

ERGEBNISSE

Der Einsatz von NCS führt zu einer deutlichen Steigerung der Menge an G6Pase-spezifischer mRNA (Abbildung 17).

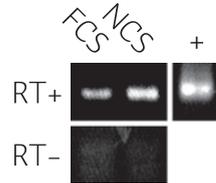


Abbildung 17: Einfluss von NCS auf die Glukose-6-Phosphatase-Expression. EBs wurden nach Abschluss des Standard-Differenzierungsprotokolls für weitere vier Tage in Anwesenheit von HGF, OSM, DEX und ITS kultiviert. In einem Ansatz wurde dabei das FCS durch NCS ersetzt. Im Anschluss wurde RNA isoliert und die Expression des G6Pase-Gens mittels RT-PCR analysiert. Der Wechsel des Serums zu NCS führt dabei zu einer gesteigerten Genexpression. Als Positivkontrolle für die PCR (+) diente cDNA aus adulter Mausleber. **RT+**: RT-Positiv-Ansatz; **RT-**: RT-Negativ-Ansatz der entsprechenden cDNA-Synthese.

IV.2.2 Differenzierung in Monolayer-Kultur

IV.2.2.1 Einfluss von Retinsäure und leukemia inhibitory factor auf die Entstehung entodermaler Zelltypen in Monolayer-Kultur

Teratani und Koautoren veröffentlichten 2005 ein Protokoll, welches die Differenzierung muriner ES-Zellen zu hepatozytenähnlichen Zellen in *Monolayer*-Kultur ermöglicht (Teratani et al., 2005). Der erste Schritt ist dabei die durch all-*trans*-Retinsäure (RS) induzierte Differenzierung zu entodermalen Zelltypen in Anwesenheit von LIF. Da sich die Kultivierungsbedingungen der undifferenzierten ES-Zellen von denen in dieser Arbeit deutlich unterscheiden (Kultivierung auf mitotisch inaktivierten *Feeder*-Zellen anstatt auf mit Gelatine beschichteten Platten und 100 U/ml LIF anstatt 1000 U/ml), wurde der Einfluss von RS in Abhängigkeit der LIF-Konzentration auf die Entstehung entodermaler Zelltypen in der Kultur untersucht. Hierfür wurden undifferenzierte ES-Zellen für 3 Tage in ES-Medium mit unterschiedlichen Mengen an LIF kultiviert. Zu einigen Ansätzen wurde zusätzlich 10^{-8} M all-*trans*-Retinsäure gegeben. Anschließend wurden die Zellen wie unter III.2.12.2 beschrieben weiterkultiviert und an Tag 4 des Differenzierungsprotokolls die Expression des Transthyretins als entodermaler Marker untersucht. Die Anwesenheit von all-*trans*-Retinsäure im Medium zeigt sich dabei als essentiell für die Expression (Abbildung 18A). LIF hat einen konzentrationsabhängigen, negativen Einfluss auf die Markerexpression. Eine dem-

entsprechende Änderung des Differenzierungsprotokolls beeinträchtigt nicht die Fähigkeit der Zellen, zu hepatozytenähnlichen Zellen zu differenzieren (Abbildung 18B).

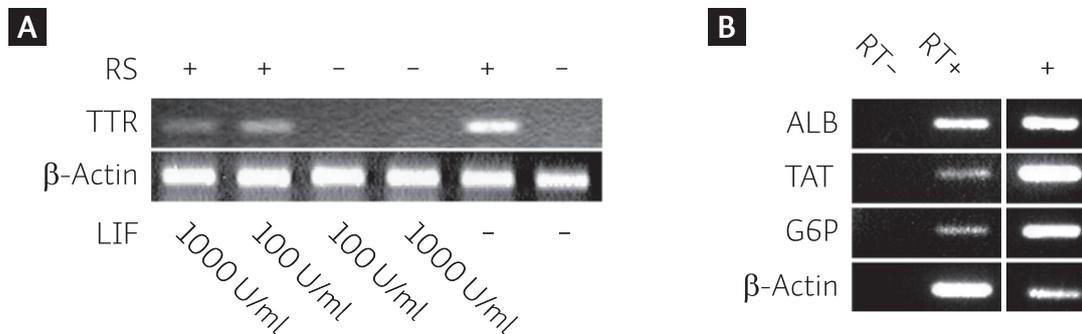


Abbildung 18: Einfluss von Retinsäure und LIF auf die Differenzierung in Monolayer-Kultur. **A** CGR8-ES-Zellen wurden wie unter III.2.12.2 beschrieben für 3 Tage in Anwesenheit unterschiedlicher LIF-Konzentrationen kultiviert. Bei einigen Ansätzen wurde zusätzlich auf Retinsäure (RS) im Differenzierungsmedium verzichtet. An Tag 4 des Differenzierungsprotokolls wurde Gesamt-RNA isoliert und der Level der *Ttr*-Expression mittels RT-PCR untersucht. Ohne RS kommt es zu keiner Expression des entodermalen Markergens. LIF hat einen konzentrationsabhängigen, negativen Einfluss. **B** Nach Abschluss des entsprechend veränderten Differenzierungsprotokolls (Tag 10) wurde ebenfalls die Gesamt-RNA isoliert und auf die Anwesenheit leberspezifischer RNAs untersucht. Unter den neuen Kultivierungsbedingungen differenzieren die Zellen weiterhin zu hepatozytenähnlichen Zellen. **RT-**: Tag 10-RT-Negativ-Ansatz, **RT+**: Tag 10-RT-Positiv-Ansatz (cDNA), **+**: cDNA aus Lebergewebe.

IV.2.3 Zwischenzusammenfassung 1

Die Ergebnisse zur Etablierung und Optimierung des EB-basierten Differenzierungsprotokolls zeigen, dass eine Anpassung der Bedingungen – im Speziellen der Zeitpunkte der Faktorenzugabe sowie der verwendeten Kälberseren – einen deutlichen Einfluss auf die Expression leberspezifischer Markergene hat. Weder ein zeitlich begrenzter Serumentzug noch die Zugabe von FGF-4, wie sie in anderen Protokollen beschrieben sind, führen im verwendeten Differenzierungsprotokoll zu der erhofften Effizienzsteigerung. Auch die Versuche in *Monolayer*-Kultur verdeutlichen die Wichtigkeit, bestehende Protokolle auf die jeweiligen Bedingungen anzupassen.

IV.3 Generierung eines Systems zur Visualisierung, Selektionierung und Isolierung unterschiedlicher Differenzierungsstadien während des Differenzierungsprozesses

Für eine genaue Analyse des Differenzierungsprozesses wird ein System benötigt, das eine Identifizierung und Isolierung erfolgreich differenzierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Differenzierungsprozesses ermöglicht. Da weder reife Hepatozyten noch ihre Vorläuferzellen spezifische Oberflächenmarker besitzen, wurden die regulatorischen Elemente verschiedener Differenzierungsmarker ausgewählt und vor unterschiedliche Reportergene gesetzt. Diese Kassetten sollten im Anschluss stabil in das Genom undifferenzierter ES-Zellen integriert werden, um eine zell- und entwicklungsspezifische Expression der Reportergene zu erzielen. Durch Einsatz von Resistenzmarkern bzw. Genen, die für Fluoreszenzproteine kodieren, soll so eine Identifizierung und/oder Isolierung der Zellen ermöglicht werden.

IV.3.1 Funktionalität der ausgewählten regulatorischen Elemente in der Zellkultur

Als entwicklungsspezifische regulatorische Elemente wurden die Promotoren bzw. Promotor/Enhancer-Regionen des Transthyretins (als frühen entodermalen Marker), des Albumins (als frühen leberspezifischen Marker) bzw. des Glukose-6-Phosphatase-Gens (als Marker für reife Hepatozyten) gewählt.

Um die Funktionalität und Spezifität der gewählten Elemente zu testen, wurden eukaryotische Expressionsvektoren geschaffen, die das Albumin- und Glukose-6-Phosphatase-Promotorkonstrukt vor der Sequenz des DsRed2-ORFs enthielten (p2335A-1DsRed2_polyA, pcDNA3.1G6P-DsRed2). Für das Transthyretin-Promotorkonstrukt war mit dem Plasmid pcDNA3_TTR-nucGFP schon ein Konstrukt vorhanden, das den offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) eines für ein Fluoreszenzprotein kodierenden Gens unter der Kontrolle des Promotorkonstruktes enthielt. Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs wurden im Anschluss mit den Vektoren transfiziert und nach 48 Stunden auf die Synthese der Fluoreszenzproteine untersucht. Alle Promotor-Konstrukte zeigen eine deutliche Aktivität in Zellen hepatischen Ursprungs (Abbildung 19).

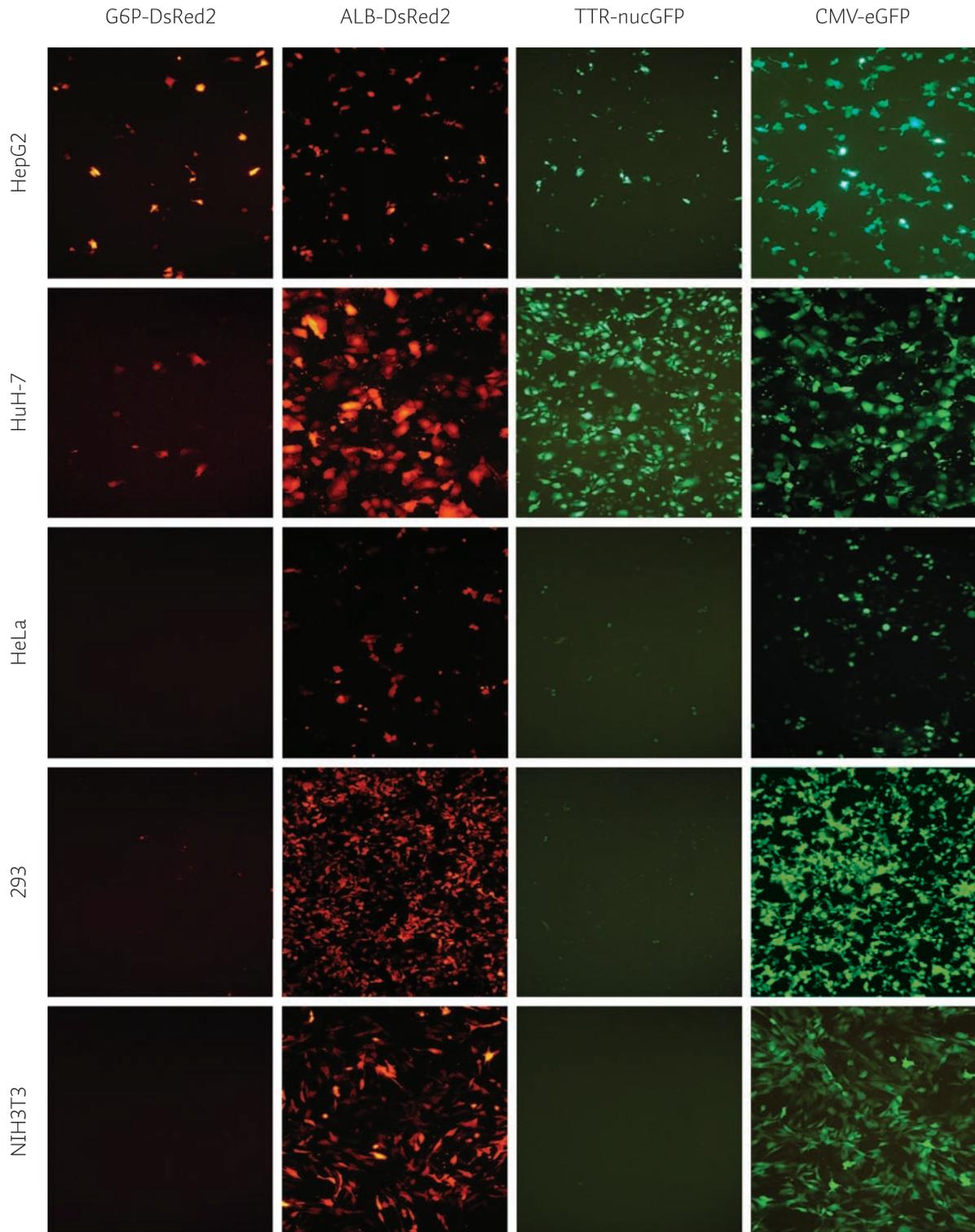


Abbildung 19: Expression der Reporterkonstrukte in der Zellkultur. Die Vektoren pcDNA₃-TTR-nucGFP, p2335A-1DsRed2.polyA und pcDNA₃-1G6P-DsRed2 wurden in unterschiedliche Zelllinien transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf die Expression der Fluoreszenzproteine untersucht. Sowohl der G6Pase-Promotor als auch der -3kb-TTR-Promotor zeigen eine spezifische Expression ihrer nachgeschalteten Gene in Zellen hepatischen Ursprungs (HepG2, HuH-7). Das ALB-Promotor/Enhancer-Konstrukt ist in allen Zellen aktiv. Als Kontrolle diente der Vektor pEGFP-N₁, der eine Expression des eGFP-Gens unter der Kontrolle des CMV_{EA}-Promotors ermöglicht.

Dabei liegt die des G6Pase-Promotors zumindest in HuH-7-Zellen deutlich unter der Aktivität der anderen beiden Konstrukte. Das ALB-Promotor/Enhancer-Konstrukt führt, entgegen seiner Spezifität in transgenen Mäusen, auch in einer zervikalen, renalen und einer Fibroblastenzelllinie zur Expression des Fluoreszenzgens.

IV.3.2 Herstellung transgener ES-Zellen mittels eines Moloney-Maus-Leukämie-Virus-basierten retroviralen Gentransfers

Als ein mögliches Verfahren, die gewünschten Kassetten aus den getesteten Promotor-Konstrukten mit nachgeschalteten Reportergenen stabil in das Genom undifferenzierter ES-Zellen zu integrieren, wurde der retrovirale Gentransfer gewählt. Diese Methode zeigt häufig eine hohe Transfektionseffizienz und führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer stabilen Integration des gesamten gewünschten Abschnitts in das Empfänger-genom.

Der Einsatz MMLV-basierter Vektoren des Retro-X™ Q-Vektorsets (Takara Bio Europe/Clontech, ehemals BD Bioscience, Frankreich) ermöglicht den Transfer von bis zu 6,5 kb fremder DNA (Angabe des Herstellers). Ferner verhindert die Verwendung des gp70-Oberflächenproteins die Infektion mCAT-1-negativer humaner Zellen (Oie et al., 1976; Albritton et al., 1989; Kim et al., 1991; Wang et al., 1991a). Auf diese Weise verringert sich das Risikopotential erzeugter Viruspartikel.

IV.3.2.1 Klonierung der retroviralen Expressionskonstrukte

Für die Etablierung des retroviralen Gentransfers wurden zwei Kontrollkonstrukte hergestellt. pQCeCFPIP ermöglicht die Expression des eCFP- und des Puromycin-Gens unter der Kontrolle des CMV_{EA}-Promotors. Dieser ermöglicht die Expression nachgeschalteter Gene in einer Vielzahl eukaryotischer Zellen. Hierfür wurde der ORF des eCFP-Gens mittels des Primerpaares eCFP-BamFW/eCFP-BamBW amplifiziert und über die *Bam*HI-Schnittstelle in den Vektor pQCXIP gesetzt.

Die Aktivität des CMV_{EA}-Promotors in undifferenzierten ES-Zellen ist umstritten (Chung et al., 2002; Ward und Stern, 2002; Zeng et al., 2003). Deshalb wurde für die zweite Positivkontrolle der CMV-Promotor durch einen CAG-Hybridpromotor (CMV_{EA}-Enhancer / *chicken* β -Actin-

Promotor / *rabbit* β -Globin-Intron) ersetzt. Hierfür wurde der CAG-Promotor aus pCAGGS(Linker) (*SpeI*(*blunt*)/*NotI*) in pQCeCFPIP (*XbaI*(*blunt*)/*NotI*) kloniert. Das resultierende Konstrukt trägt den Namen pQCAG-eCFPIP.

Die retroviralen Reporterkonstrukte müssen neben dem entwicklungsspezifischen Promotor und dem ORF für das Fluoreszenzprotein auch einen Marker besitzen, der eine Selektion stabil transfizierter ES-Zellklone ermöglicht (Abbildung 20).

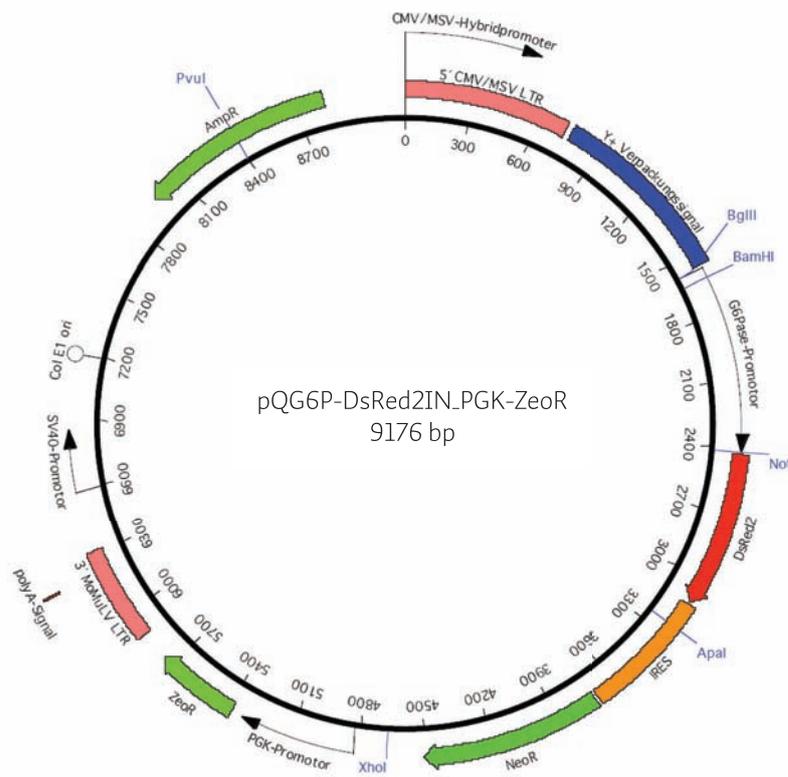


Abbildung 20: Aufbau der retroviralen Reporterkonstrukte am Beispiel des Plasmids pQG6P-DsRed2IN.PGK-ZeoR. Der Vektor enthält alle Elemente, die für die Transkription der viralen genomischen DNA, die Verpackung der viralen RNA und die Integration in das Genom der infizierten Zelle benötigt werden. Der ursprünglich vorhandene interne CMV-Promotor wurde durch einen zell- bzw. entwicklungsspezifischen Promotor ersetzt. Um eine Selektion stabil transfizierter ES-Zellen zu ermöglichen, wurde der ORF des Zeocin-resistenzgens (**ZeoR**) unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase (**PGK**)-Promotors integriert. Um eine vollständige Transkription der viralen DNA zu gewährleisten, verwenden alle Expressionseinheiten das im Bereich der 3'LTR gelegene Polyadenylierungssignal (**polyA-Signal**). Ψ^+ : Verpackungssignal; **AmpR**: *E. coli* Ampicillin-resistenzgen; **Col E1 ori**: bakterieller Replikationsursprung; **NeoR**: Neomycinresistenzgen. In der Karte zusätzlich eingetragen sind die Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen.

Für das Plasmid pQTTR-nucGFPIP_PGK-ZeoR wurde der -3kb-TTR-Promotor aus pcDNA3_TTR-nucGFP (*XbaI*/*BamHI*) in pQCXIP (*XbaI*/*BamHI*) kloniert. Der CMV-Promotor wurde dabei ersetzt. Anschließend wurde der nucGFP-ORF ebenfalls aus

pcDNA3_TTR-nucGFP (*Bam*HI/*Xba*I(*blunt*)) ausgeschnitten und über *Bam*HI/*Eco*RI(*blunt*) in den Vektor ligiert. Als zusätzlichen Selektionsmarker für stabil transfizierte ES-Zellen wurde der ORF des Zeocinresistenz-Gens unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotors aus pDR1Bsd (*Acc*I(*blunt*)/*Xba*I(*blunt*)) in den mit *Pvu*II geschnittenen Vektor ligiert.

Der Vektor pQALB-eCFPIH_PGK-ZeoR entstand durch Ligation des ALB-Promotor/Enhancer-Konstrukts aus p2335A-1 (*Not*I(*blunt*)/*Bam*HI) in pQCXIH (*Bgl*II(*blunt*)/*Bam*HI). Der CMV-Promotor wurde dabei wieder ersetzt. Der ORF des eCFP-Gens wurde mittels der Primer eCFP-BamFW/eCFP-BamBW amplifiziert und in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors kloniert. Das PGK-Promotor/Zeoicnresistenz-ORF-Konstrukt wurde wieder *Acc*I(*blunt*)/*Xba*I(*blunt*) aus pDR1Bsd herausgeschnitten und in den *Eco*RV-geschnittenen Vektor ligiert.

Für das Plasmid pQG6P-DsRed2IN_PGK-ZeoR (Abbildung 20) wurde der G6Pase-Promotor mit Hilfe der Primer G6Pr_FW_Bgl/G6Pr_BW_Not aus genomischer DNA von FVB-Mäusen (FVB/N CrlBR) amplifiziert und in den mit *Not*I und *Bam*HI geschnittenen Vektor pQCXIN ligiert, wobei der interne CMV-Promotor ebenfalls wieder ersetzt wurde. Der DsRed2-ORF stammt aus pDsRed2-N1 (*Not*I(*blunt*)/*Pin*AI) und wurde in den *Eco*RI(*blunt*)/*Pin*AI-geschnittenen Vektor ligiert. Der Zeocinresistenz-ORF unter der Kontrolle des PGK-Promotors (*Acc*I(*blunt*)/*Xba*I(*blunt*)) aus pDR1Bsd) wurde in die *Eco*RV-Schnittstelle des Vektors kloniert.

Alle Klonierungsschritte wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft. Die Übergänge und durch PCR generierte Fragmente wurden zusätzlich sequenziert. Die Konstrukte sollten nach Integration in das Genom undifferenzierter ES-Zellen zu einer zell- und entwicklungspezifischen Synthese der Fluoreszenzproteine und der über die *internal ribosomal entry site* (IRES) kotranslatierten Resistenzproteine führen. Dies sollte eine Identifizierung, Quantifizierung und Selektionierung hepatischer Vorläufer unterschiedlicher Entwicklungsstadien ermöglichen.

IV.3.2.2 Produktion infektiöser rekombinanter MMLV-Partikel

Um die Funktionalität der erzeugten retroviralen Expressionskonstrukte zu überprüfen, wurden mit den Plasmiden Viruspartikel produziert (siehe Abschnitt III.2.6). Mit den 48 h-Überständen wurden dann NIH3T3-Zellen infiziert.

Eine Infektion mit den beiden durch Transfektion der Kontrollkonstrukte pQCeCFPIP und pQCAG-eCFPIP erzeugten Viren (CMV-eCFP-Virus bzw. CAG-eCFP-Virus) führt zu einer deutlichen Synthese der Fluoreszenzproteine in infizierten Zellen (Abbildung 21).

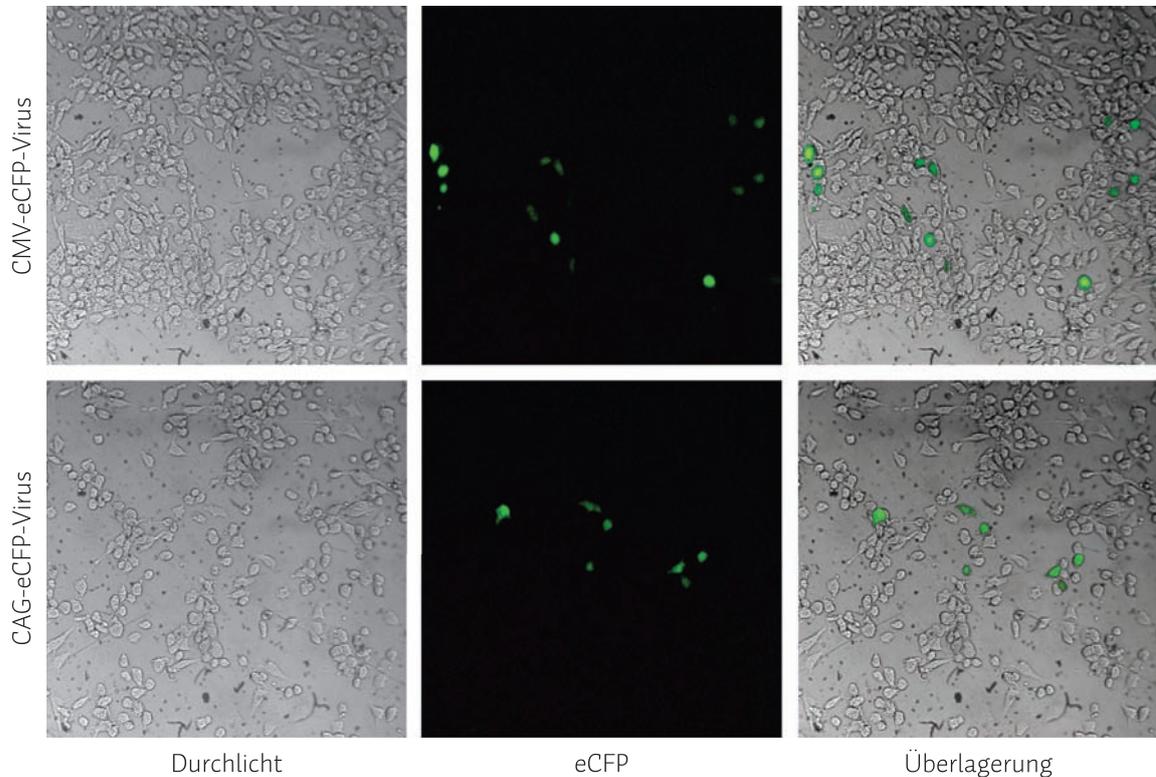


Abbildung 21: Infektion von NIH₃T₃-Zellen mit Kontrollviren. BD EcoPack²TM-293-Zellen wurden mit den Plasmiden pQCeCFPIP und pQCAG-eCFPIP transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Viren im Überstand geerntet und auf NIH₃T₃-Zellen gegeben. Weitere 48 Stunden später wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Beide Überstände enthielten infektiöse Viruspartikel. Infizierte Zellen synthetisieren eCFP.

Die erreichten Titer lagen für pQCeCFPIP in der Regel zwischen $8 \cdot 10^3$ und $2 \cdot 10^4$ Viren/ml. Der Titer an CAG-eCFP-Viren lag im Schnitt um den Faktor 50 niedriger.

Die durch Transfektion mit den Konstrukten pQTTR-nucGFPIP_PGK-ZeoR, pQALB-eCFPIH_PGK-ZeoR und pQG6P-DsRed2IN_PGK-ZeoR erzeugten Viruspartikel (im Folgenden als TTR-nucGFP-Virus, ALB-eCFP-Virus und G6P-DsRed2-Virus bezeichnet) führen nach Infektion von NIH₃T₃-Fibroblasten aufgrund ihrer spezifischen internen Promotoren erwartungsgemäß zu keiner Synthese der Fluoreszenzproteine. Der Nachweis einer Infektion bzw. eine Titerbestimmung kann somit nur durch die Selektion Zeocin-resistenter Zellen oder mittels PCR durchgeführt werden. Um sicherzustellen, dass es sich bei den selektionierten Zellen nicht um durch Mutation entstandene Resistenzmechanismen handelt, wurde nach Infektion von NIH₃T₃-Zellen

ERGEBNISSE

mit den drei Reporterviren die genomische DNA selektionierter Zellen isoliert und die Integration der für die Fluoreszenzproteine kodierenden Sequenzen durch PCR bestätigt (Abbildung 22). Die erreichten Virentiter lagen dabei mit $1 \cdot 10^2$ Viren/ml für das ALB-eCFP-Virus über $2 \cdot 10^2$ Viren/ml für das TTR-nucGFP-Virus bis maximal $2 \cdot 10^3$ Viren/ml für das G6P-DsRed2-Virus noch deutlich unter denen der Kontrollviren.

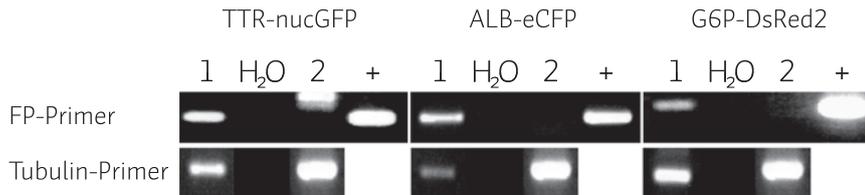


Abbildung 22: Genotypisierung infizierter NIH₃T₃-Zellen. Mit den rekombinanten MMLV-Partikeln infizierte NIH₃T₃-Zellen wurden mittels Zeocin selektioniert. Im Anschluss wurde genomische DNA isoliert und auf die Integration der für die Fluoreszenzproteine kodierenden Sequenzen überprüft. Die Fluoreszenzprotein-spezifischen Primer nucGFP_FW.G/nucGFP_BW.G, DsRed2_FW.G/DsRed2_BW.G bzw. EXFP_FW.G/EXFP_BW.G (FP-Primer) liefern ein deutliches Signal bei der DNA aus selektionierten Zellen (Spur 1). Als Negativkontrolle diente genomische DNA aus nicht infizierten Zellen (Spur 2), als Positivkontrolle (+) wurde gereinigte Vektor-DNA eingesetzt. Die Integrität der genomischen DNA wurde mittels einer Kontroll-PCR mit Tubulin-spezifischen Primern bestätigt.

IV.3.2.3 Polyethylenglykol-Präzipitation der Virusüberstände

Um eine effiziente Infektion der ES-Zellen zu ermöglichen, werden hochtitrige Viruspräparationen benötigt. Nach der Ernte befinden sich die Viren in bis zu 48 Stunden durch die Verpackungszelllinie konditioniertem Medium. Dieses enthält möglicherweise eine Reihe von Faktoren, die sich negativ auf den Differenzierungszustand der ES-Zellen auswirken könnten. Aus diesem Grund wurde versucht, die Viruspartikel mittels Polyethylenglykol (PEG) aus dem Überstand der Verpackungszelllinie zu fällen und es wurde überprüft, ob diese dabei ihre Infektiosität behalten. Hierfür wurden BD EcoPack2™-293-Zellen mit pQCeCFPIP transfiziert und 48 Stunden später die Viren geerntet. Um den Titer an infektiösen Viren zu bestimmen, wurden mit einem Teil des Überstandes NIH₃T₃-Zellen infiziert. Aus 10 ml Überstand wurden wie unter III.7.3 beschrieben die Viren gefällt und in ca. 100 µl frischem Medium resuspendiert. Zur Titerbestimmung wurden mit den resuspendierten Viren ebenfalls NIH₃T₃-Zellen infiziert. Die Fällung führt zu einer Konzentrierung der Viren um einen Faktor von bis zu 100 (Abbildung 23).

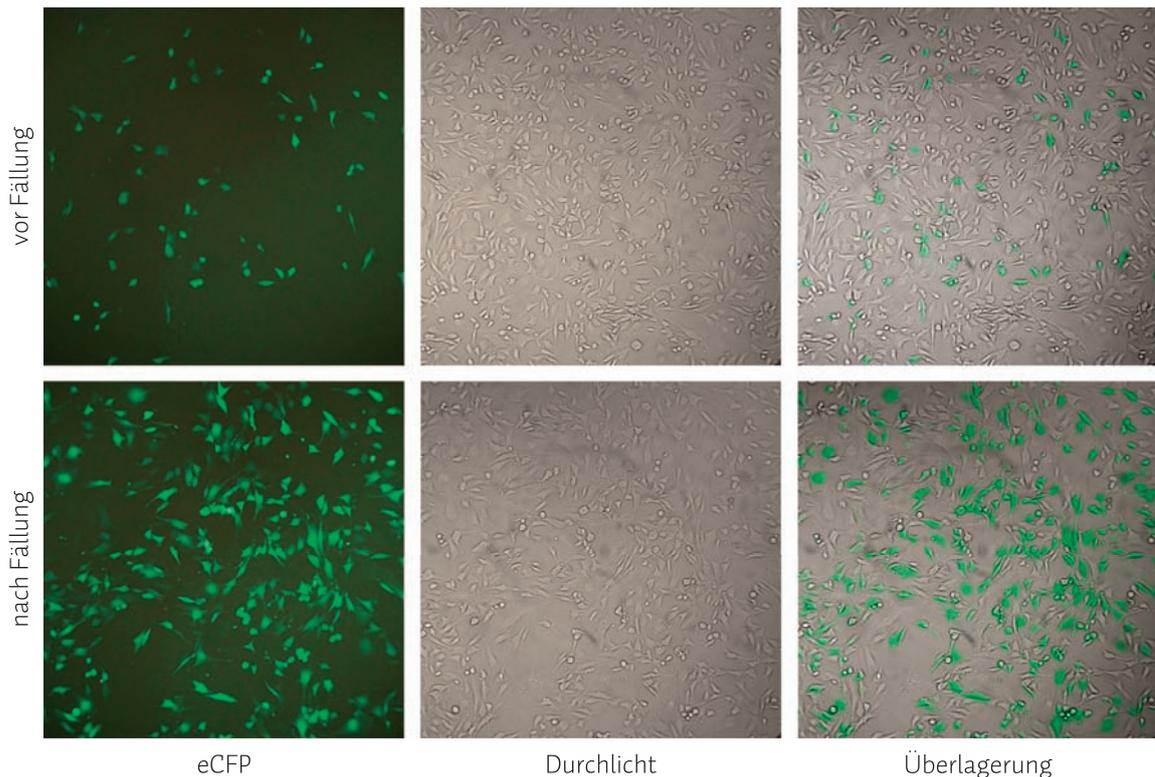


Abbildung 23: PEG-Fällung rekombinanter Viruspartikel. CMV-eCFP-Viren wurden direkt nach der Ernte bzw. nach Fällung mit PEG auf NIH₃T₃-Zellen titriert. Eine Fällung erhöht den Titer an infektiösen Viruspartikeln um einen Faktor von bis zu 100. Gezeigt ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der 1:10-Verdünnung beider Titrationsversuche.

IV.3.2.4 Infektion der ES-Zellen mit den Kontrollviren

Um zu überprüfen, ob eine Infektion der undifferenzierten ES-Zellen mit den erzeugten Viruspartikeln unter den gewählten Bedingungen möglich ist und es dabei zur Expression der integrierten Genabschnitte kommt, wurden sich schnell teilende CGR8-Zellen mit gefällten CAG-eCFP-Viren bzw. CMV-eCFP-Viren infiziert. Da eine längere Inkubation der Zellen mit dem polybrenhaltigen Infektionsmedium zu einem Verlust der Adhärenz eines Großteils der Zellen führt (nicht gezeigt), wurde die Inkubationszeit auf zwei Stunden reduziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen passagiert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen fixiert und ein Teil der Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung auf die Synthese von Oct-3/4 untersucht. Eine Auswertung der Präparate am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop zeigt eine deutliche Koexpression des Fluoreszenzproteingens mit dem Pluripotenzmarker *Oct-3/4* in mit CAG-eCFP-Viren infizierten Zellen (Abbildung 24A). Die Effizienz ist jedoch sehr gering, wie die Infektion mit hochtitrigen CMV-eCFP-Viren zeigt (Abbildung 24B).

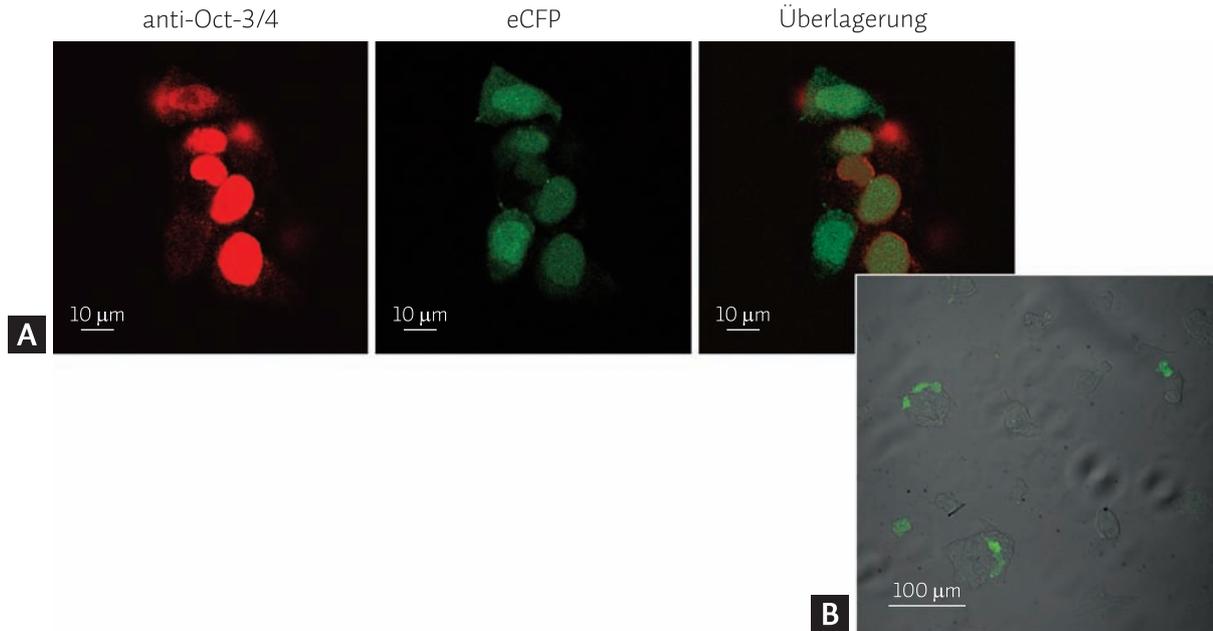


Abbildung 24: Infektion der CGR8-ES-Zellen mit Kontrollviren. **A** CGR8-Zellen wurden mit CAG-eCFP-Viren infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert und undifferenzierte Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem Oct-3/4-spezifischen Antikörper markiert (rot). Eine erfolgreiche Infektion führt zu einer Synthese des Fluoreszenzproteins (grün) in undifferenzierten Zellen. **B** Infektion von CGR8-Zellen mit CMV-eCFP-Viren bei einem Viren-Zell-Verhältnis (*multiplicity of infection*, MOI) von ca. 1 (Überlagerung aus eCFP-Kanal (grün) und Transmissionskanal). Die Infektion verläuft äußerst ineffizient. Nur ein Bruchteil der Zellen (<5 %) exprimiert das eCFP-Gen.

IV.3.2.5 Infektion der ES-Zellen mit den Reporterviren

CGR8-Zellen wurden für zwei Stunden mit 1,5 ml PEG-präzipitierter Viren infiziert (entspricht 150 ml Überstand). Die so erreichten Virentiter lagen dabei zwischen $3 \cdot 10^3$ und $2 \cdot 10^4$ Viren/ml für das ALB-eCFP-Konstrukt, zwischen $1 \cdot 10^4$ und $2 \cdot 10^4$ Viren/ml für das TTR-nucGFP-Konstrukt und zwischen $3 \cdot 10^4$ und $5 \cdot 10^5$ Viren/ml für das G6P-DsRed2-Konstrukt.

Eine Infektion mit den TTR-nucGFP- bzw. ALB-eCFP-Viren führte nach Selektion nicht zur Entstehung resistenter Kolonien undifferenzierter Zellen. Zwar zeigte sich teilweise eine sehr geringe Anzahl resistenter Zellen, jedoch ließen sich daraus nie neue undifferenzierte Linien heranzüchten.

Die Infektion der CGR8-Zellen mit den G6P-DsRed2-Viren führte zumindest in einem Fall ($5 \cdot 10^5$ Viren/ml; entsprechend $7,5 \cdot 10^5$ Viren auf $2,5 \cdot 10^5$ am Vortag ausgelegte Zellen) zur Entstehung einer Anzahl morphologisch undifferenzierter Kolonien unter Selektionsbedingungen. Etwa 30 davon erreichten eine Größe, die ein Picken der Kolonien zuließ. Ein Großteil der Klone

ließ sich allerdings nicht weiter vermehren. Nur von 4 der ursprünglich 30 Klone konnten permanente Linien etabliert werden. Eine Genotypisierung der Klone mittels PCR zeigt, dass in allen Fällen eine Integration der gewünschten Sequenz erfolgt war (Abbildung 25).

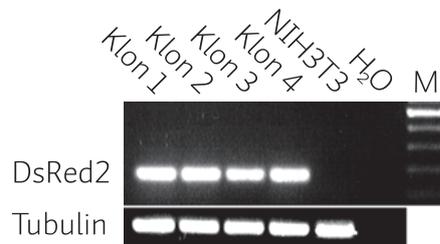


Abbildung 25: Genotypisierung der durch Infektion mit GFP-DsRed2-Viren erzeugten Zelllinien. Aus allen vier erzeugten Zelllinien wurde genomische DNA isoliert. Die Integration der gewünschten Sequenzen wurde mittels PCR mit dem DsRed2-spezifischen Primerpaar DsRed2.FW.G/DsRed2.BW.G nachgewiesen. Die Integrität der genomischen DNA wurde mit β -Tubulin-spezifischen Primern überprüft. Als Negativkontrolle diente genomische DNA aus NIH₃T₃-Zellen bzw. Wasser. **M:** DNA-Größenstandard.

IV.3.3 Herstellung transgener ES-Zellen durch Transfektion und homologe Rekombination

Als parallele Strategie zur Erzeugung transgener Zelllinien wurde die Integration der gewünschten Reporterkonstrukte in einen definierten Genort durch homologe Rekombination gewählt. Hierfür wurden die erzeugten Expressionskassetten in den Vektor pROSA26-1 gesetzt, der eine gezielte Integration in den ROSA26-Lokus ermöglicht (Soriano, 1999). Dieser liegt im ersten Intron eines während der Entwicklung ubiquitär exprimierten Gens mit bis dato unbekannter Funktion (Zambrowicz et al., 1997). Um zu verhindern, dass es durch eine während der Klonierung möglicherweise entstehende, kryptische Spleiß-Akzeptor-Stelle zur Expression der Reportergene vom ubiquitär aktiven ROSA26-Promotor kommt (Zambrowicz et al., 1997; Kisseberth et al., 1999), wurden wenn möglich Plasmide ausgewählt, die das Reporterkonstrukt in negativer Orientierung enthielten.

IV.3.3.1 Klonierung der pROSA26-1-Reporterkonstrukte

Zur Generierung des Plasmids pROSA26_TTR-nucGFP_PGK-ZeoR wurde das PGK-Promotor/ZeoR-resistenz-ORF-Konstrukt aus pDR1Bsd ausgeschnitten (*AccI*(blunt)/*XbaI*(blunt)) und in den mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pcDNA3.1(-) ligiert (pcDNA3.1(-)PGK-ZeoR). Eine

ERGEBNISSE

positive Orientierung des Inserts wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde der ORF des nucGFP-Gens unter der Kontrolle des -3kb-TTR-Promotors aus pcDNA3_TTR-nucGFP (*XbaI*) in ebenfalls positiver Orientierung in den oben erzeugten mit *XbaI* verdauten Vektor ligiert. Der Vektor wurde mit *ApaI*(*blunt*) und *PvuII* verdaut und das Fragment, bestehend aus dem TTR-Promotor vor dem nucGFP-ORF, dem PGK-Promotor vor dem Zeocinresistenz-ORF und dem BGH-Polyadenylierungssignal aus pcDNA3.1(-), in die *XbaI*-Schnittstelle (*blunt*) von pROSA26-1 ligiert. Der Kontrollverdau des weiter verwendeten Plasmids bestätigt eine Integration des gesamten Inserts in negativer Orientierung (Abbildung 26A, Spur 1). Das Ergebnis wurde durch Sequenzierung bestätigt.

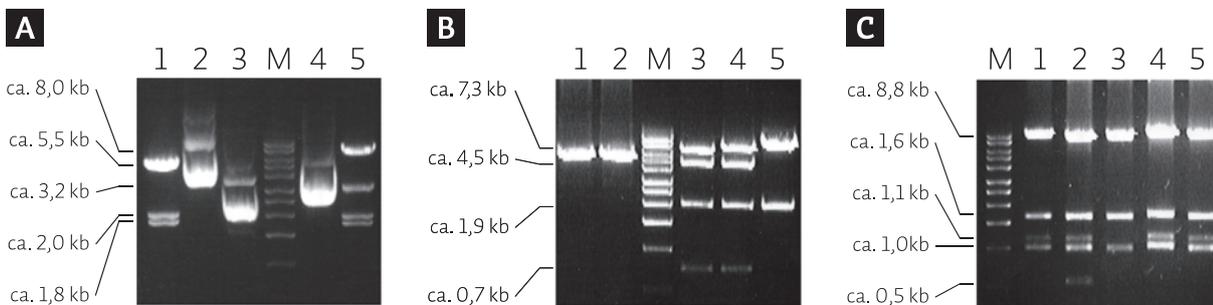


Abbildung 26: Restriktionsanalyse der erzeugten pROSA26-1-basierten Reportervektoren. Gezeigt sind die Ergebnisse der Restriktionsanalysen von je 5 Plasmidpräparationen unterschiedlicher Kolonien nach Transfektion des Ligationsansatzes des letzten Klonierungsschrittes der pROSA26-1-basierten Reporterkonstrukte. **A** *Bam*HI-Verdau putativer pROSA26.TTR-nucGFP.PGK-ZeoR-Konstrukte. Plasmid 1 zeigt die bei Integration des Inserts in negativer Orientierung erwarteten Banden bei 5870 bp, 5309 bp, 1962 bp und 1816 bp. Plasmid 5 trägt das Insert in positiver Orientierung (erwartete Banden bei 8014 bp, 3166 bp, 1962 bp und 1816 bp). **B** *Bam*HI-Verdau möglicher pROSA26.ALB-eCFP.PGK-ZeoR-Konstrukte. Plasmid 4 zeigt das erwartete Bandenmuster bei korrekter Aufnahme des Inserts in positiver Orientierung (Banden bei 7314 bp, 4480 bp, 1962 bp und 732 bp). Plasmid 3 trägt eine Deletion von ca. 700 bp im Bereich des Albumin-Enhancers. **C** *Sac*II/*Xba*I-Doppelverdau nach Ligation des G6P-DsRed2.PGK-ZeoR.BGH-polyA-Fragments in pROSA26-1. Die erwarteten Banden haben eine Größe von 8767 bp, 1600 bp, 1079 bp, 1000 bp und 534 bp bei Integration des vollständigen Inserts in positiver Orientierung (Spur 2) bzw. 8767 bp, 1616 bp und 1600 bp und 1000 bp bei Aufnahme in negativer Orientierung (Spur 3). **M**: DNA-Größenstandard (1 kb DNA-Leiter).

Für den Vektor pROSA26_ALB-eCFP_PGK-ZeoR wurde das PGK-ZeoR-Fragment inklusive des Polyadenylierungssignals aus pDR1Bsd (*AccI*(*blunt*)/*PvuI*(*blunt*)) in positiver Orientierung in p2335A-1 (*EcoRV*) kloniert (p2335A-1_PGK-ZeoR). Der eCFP-ORF wurde mit *Bam*HI aus pQCeCFPIP ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI verdauten Vektor p2335A-1_PGK-ZeoR ligiert. Der Vektor wurde anschließend mit *NotI* und *KpnI* geschnitten und das ALB-eCFP_PGK-ZeoR_BGH-polyA-Fragment *blunt* in pROSA26-1 (*XbaI*(*blunt*)) ligiert. Das im weiteren Verlauf dieser Arbeit zum Einsatz gekommene Konstrukt enthält das Insert in positiver

Orientierung (Abbildung 26B, Spur 4). Es wurde kein Plasmid isoliert, welches das Insert in negativer Orientierung enthielt.

Der Vektor pROSA26_G6P-DsRed2_PGK-ZeoR entstand durch Ligation des PGK-ZeoR_BGH-polyA-Fragments aus pDR1Bsd (*AccI*(*blunt*)/*PvuI*(*blunt*)) in pcDNA3.1G6P-DsRed2 (*EcoRV*) und anschließende Klonierung des gesamten Fragments (G6P-DsRed2_PGK-ZeoR_BGH-polyA-Fragment; *BglIII*(*blunt*)/*EcoRI*(*blunt*)) in pROSA26-1 (*XbaI*(*blunt*)). Das weiter verwendete Plasmid enthält das Konstrukt in negativer Orientierung (Abbildung 26C, Spur 3).

IV.3.3.2 Elektroporation der ES-Zellen mit den pROSA-Reporterkonstrukten

CGR8-Zellen wurden mit den drei pROSA26-1-basierten, zuvor linearisierten Reporterkonstrukten mittels Elektroporation transfiziert. Die Linearisierung erfolgte mit *AcI* (pROSA26_TTR-nucGFP_PGK-ZeoR) bzw. *KpnI* (pROSA26_ALB-eCFP_PGK-ZeoR, pROSA26_G6P-DsRed2_PGK-ZeoR). Nach erfolgter Selektion mit Zeocin zeigten sich pro Transfektionsansatz etwa 200–300 resistente Kolonien. Pro Konstrukt wurden 48 Kolonien gepickt, vermehrt und mittels PCR auf die Integration der gewünschten Sequenzen überprüft.

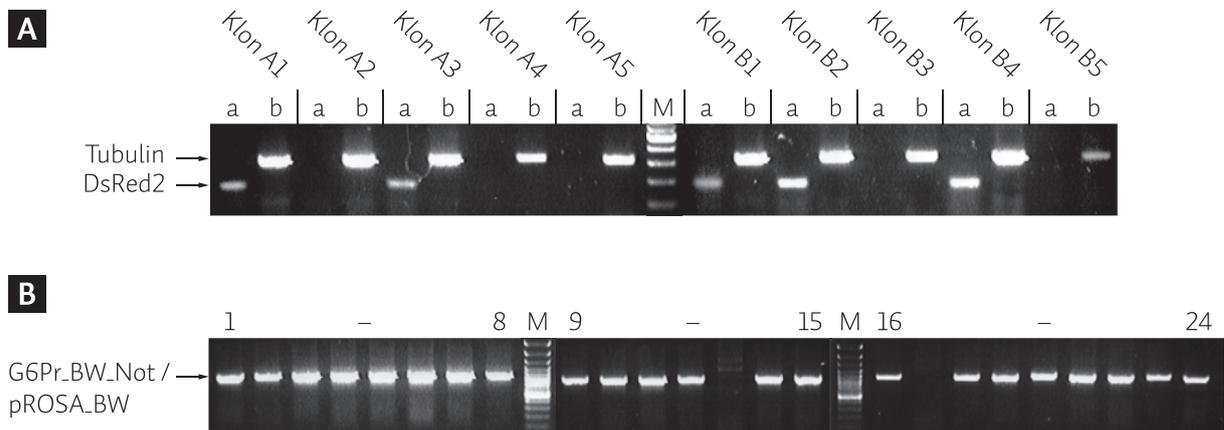


Abbildung 27: Genotypisierung nach Elektroporation resultierender Zeocin-resistenter Klone. **A** Ergebnis einer typischen Genotypisierungs-PCR am Beispiel von 10 resistenten Klonen nach Transfektion von CGR8-Zellen mit pROSA26_G6P-DsRed2_PGK-ZeoR. Resistente Kolonien wurden in 24-Well-Platten herangezogen und daraus die genomische DNA isoliert. Die Integration der für das Fluoreszenzprotein kodierenden Sequenz wurde mittels einer PCR mit DsRed2-spezifischen Primern überprüft (**a**). Die erfolgreiche Isolierung intakter chromosomaler DNA wurde mittels Tubulin-spezifischer Primer überprüft (**b**). 50 % der Klone tragen die gesuchte Sequenz. **B** Auf die Anwesenheit der DsRed2-Sequenz hin positiv genotypisierte Klone wurden mittels des Primerpaares G6Pr.BW.Not / pROSA.BW auf die Integration der vollständigen Promotorregion überprüft. Positive Klone zeigen eine deutliche Bande bei ca. 900 bp. Über 90 % der so untersuchten Klone lieferten ein deutliches Signal in der PCR.

ERGEBNISSE

Die Genotypisierung zeigt, dass etwa 50 % der resistenten Klone auch die Sequenzen der Fluoreszenzprotein-Gene enthalten (Abbildung 27A). Ein Großteil dieser Klone hat auch die Sequenz des vorgeschalteten regulatorischen Elements vollständig integriert (Abbildung 27B). Der Anteil ist abhängig von der Größe des Promotor-Konstrukts und liegt zwischen etwa 60 % für den -3kb-TTR-Promotor über ca. 75 % für das ALB-Promotor/Enhancer-Konstrukt bis hin zu über 90 % für den G6Pase-Promotor. Somit konnte für jedes der drei Konstrukte eine Reihe von Zelllinien etabliert werden, die die vollständige Reporterengenkassette stabil in das Genom integriert haben.

IV.3.4 Detektion hepatozellulärer Vorläufer mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

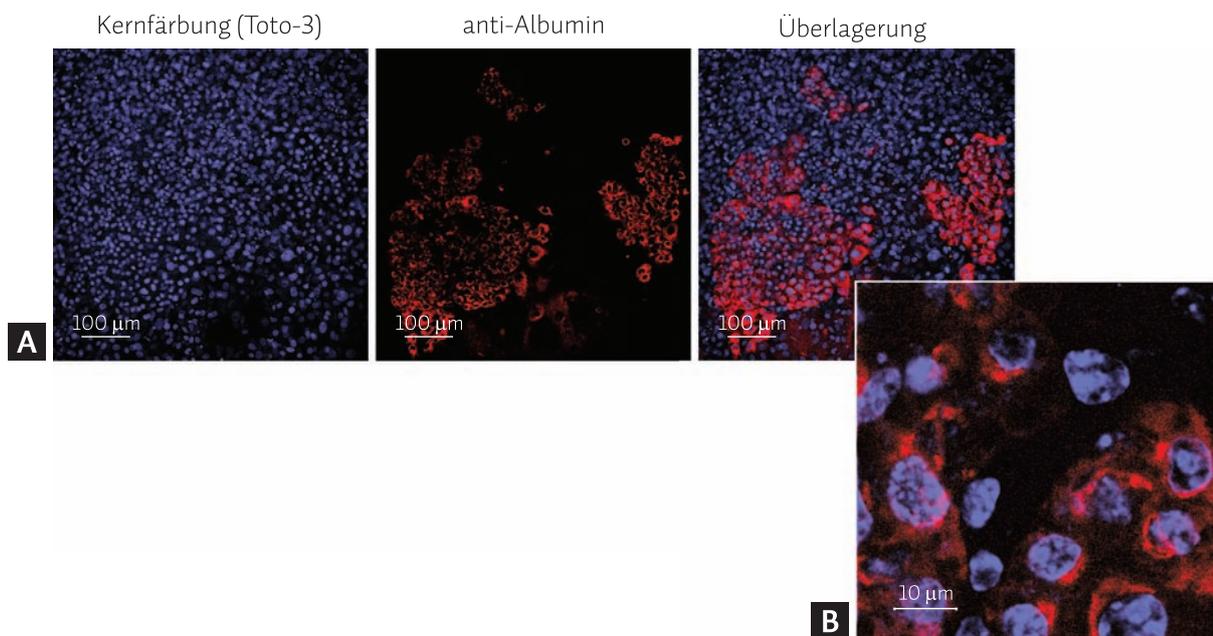


Abbildung 28: Konfokale Aufnahme nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung Albumin-positiver Zellen in EBs. **A** CGR8-ES-Zellen wurden wie unter III.2.12.1 beschrieben zur Differenzierung zu Hepatozyten angeregt. An Tag 18 des Differenzierungsprotokolls wurden die EBs fixiert und mit einem anti-Mausalbumin-Serum inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem Cy³-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG. Das Serum reagiert mit eindeutig zu identifizierenden Bereichen innerhalb der EBs (rote Färbung). **B** Die Vergrößerung zeigt eine spezifische Färbung perinukleärer Strukturen, wie sie für sezernierte, am rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisierte Proteine typisch ist.

Um überprüfen zu können, ob eine etwaige Synthese der Fluoreszenzproteine in den transgenen ES-Zellen auch spezifisch in Zellen erfolgt, die in Richtung Hepatozyten differenzieren, ist eine eindeutige Identifizierung solcher Zellen auf einem unabhängigen Weg notwendig. Dies ist unter anderem mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung möglich.

Um frühe Phasen der Differenzierung erfassen zu können, würden sich Untersuchungen mit gegen Transthyretin oder α -1-Antitrypsin gerichteten Antikörpern anbieten. Es standen aber leider keine Antikörper mit hinreichender Spezifität zur Verfügung, die eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse brachten. Die Markierung differenzierter Zellen mit dem verwendeten anti-Mausalbumin-Serum und eine anschließende Färbung durch Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper erlaubt jedoch eine spezifische Detektion Albumin-produzierender Zellen in EBs (Abbildung 28).

IV.3.5 Reporterexpression in den transgenen ES-Zellen

Um zu überprüfen, ob es während der *in vitro*-Differenzierung der transgenen ES-Zelllinien zu einer spezifischen Expression der integrierten Reporterkonstrukte kommt, wurden die Zellen, wie unter III.2.12.1 beschrieben, zur Differenzierung zu Hepatozyten angeregt. Die EBs wurden je nach Reporterkonstrukt zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Parallel wurde RNA isoliert, um die Expression der Konstrukte auf Transkriptionsebene zu charakterisieren. Da für eine Immunfluoreszenzfärbung keine geeigneten Antikörper gegen Transthyretin zur Verfügung standen, wurden pROSA26_TTR-nucGFP_PGK-ZeoR-transgene ES-Zellen zusätzlich mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) untersucht. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob es nach einer Differenzierung zu TTR-positiven Zellen zu einer Produktion des nucGFP-Proteins kommt. Da sich in EBs differenzierende Zellen schwer vollständig vereinzeln lassen, erfolgte die Differenzierung wie unter III.2.12.2 beschrieben in *Monolayer*-Kultur.

Keine der überprüften Zelllinien, die das pROSA26_TTR-nucGFP_PGK-ZeoR-Konstrukt tragen, zeigt in der Fluoreszenzmikroskopie an Tag 10 des EB-basierten Differenzierungsprotokolls ein erkennbares Signal, das über dem der WT-Kontrolle liegt (n=6, nicht gezeigt). Die RT-PCR mit nucGFP-spezifischen Primern ergibt jedoch bereits in undifferenzierten Zellen ein deutliches Produkt, das auch nach dem Einsetzen der endogenen *Ttr*-Expression an Tag 10 nicht zunimmt (Abbildung 29A). Die FACS-Analyse an Tag 4 des Differenzierungsprotokolls in *Monolayer*-Kultur zeigt nach Anregung bei 488 nm im Falle der WT-Zellen zwei Populationen mit unterschiedlich hoher Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich. Bei den drei untersuchten transgenen Linien

ERGEBNISSE

hingegen kommt es zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität einer Subpopulation von Zellen, die sich in einer Reduzierung des linken, und einer Zunahme des rechten Gipfels im Histogramm widerspiegelt (Abbildung 29B).

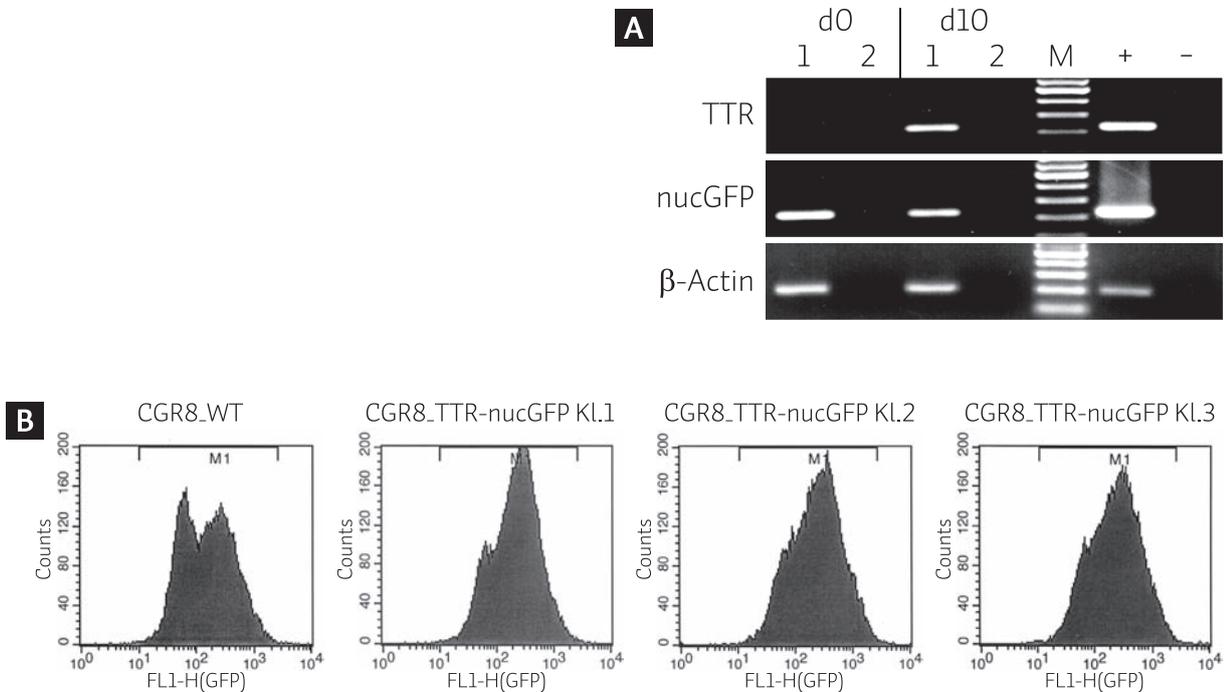


Abbildung 29: Reporter-Expression in pROSA26-TTR-nucGFP-transgenen ES-Zellen. **A** Durch Elektroporation des Vektors pROSA26-TTR-nucGFP-PGK-ZeoR stabil transfizierte CGR8-Zellen (CGR8.pROSA.TTR-nucGFP) wurden wie unter III.2.12.1 beschrieben über die Bildung von EBs zur Differenzierung zu hepatozytenähnlichen Zellen angeregt. An Tag 0 (**do**, undifferenziert) und Tag 10 (**d10**) des Differenzierungsprotokolls wurde Gesamt-RNA isoliert und auf die Expression von *Ttr* bzw. des nucGFP-Reportergens untersucht. Spur **1** zeigt jeweils das Ergebnis der RT-PCR, Spur **2** das Resultat der PCR aus der RT-Negativ-Kontrolle. **+**: Positivkontrolle mit cDNA aus Lebergewebe bzw. Vektor-DNA als Matrize. **-**: Wasserkontrolle. **B** Drei unabhängige CGR8.pROSA.TTR-nucGFP-Klone wurden mit Hilfe von all-trans-Retinsäure wie unter III.2.12.2 beschrieben zur Differenzierung zu Transthyretin-positiven Zellen angeregt. An Tag 4 wurden die Zellen vereinzelt und mittels FACS-Analyse auf die Synthese des nucGFP-Proteins untersucht. Gezeigt ist das Ergebnis von 50000 Mess-Ereignissen. Als Kontrolle dienten CGR8-Wildtyp-Zellen (CGR8-WT).

Drei der überprüften Zelllinien ($n=6$), welche stabil mit pROSA26-ALB-eCFP-PGK-ZeoR transfiziert wurden, zeigen an Tag 15 der Differenzierung in EBs Bereiche erhöhter Fluoreszenz im zyanfarbigen Spektrum. Diese ist bei zwei der Linien jedoch sehr schwach ausgeprägt. Eine zusätzliche Gegenfärbung mit dem Kaninchen-anti-Mausalbumin-Serum zeigt, dass die Fluoreszenz spezifisch für Albumin-produzierende Zellen ist (Abbildung 30A).

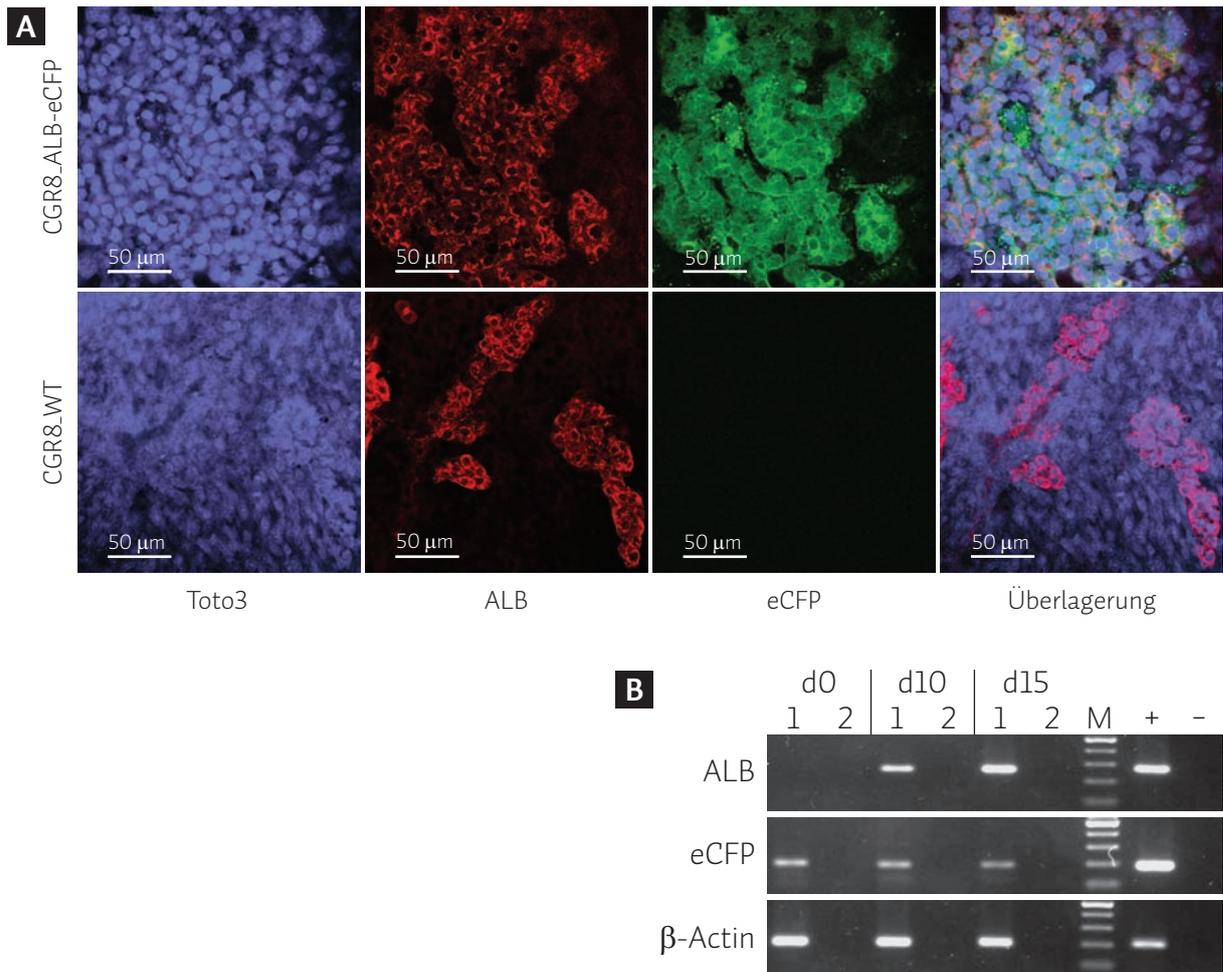
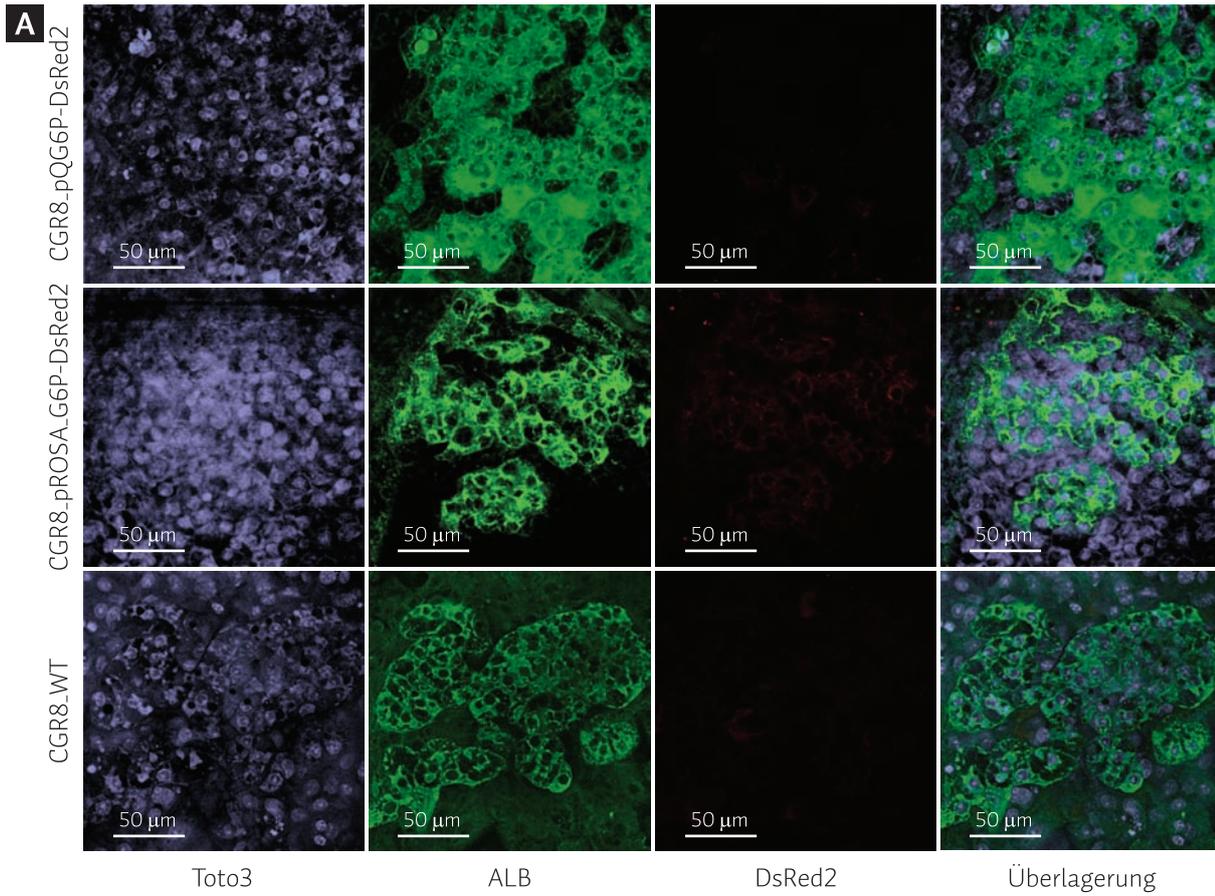


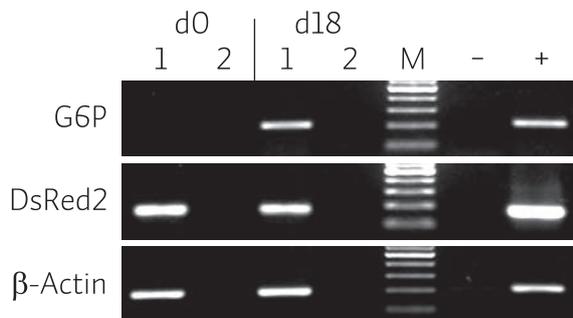
Abbildung 30: Reporter-Gen-Expression in pROSA26-ALB-eCFP-transgenen ES-Zellen (CGR8-pROSA-ALB-eCFP). **A** Detektion der eCFP-Produktion mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellen wurden an Tag 15 des EB-basierten Differenzierungsprotokolls fixiert. Es erfolgte eine Markierung Albumin-positiver Zellen mittels des anti-Mausalbumin-Serums und anschließender Färbung mit Cy³-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgGs (rot). Die transgenen Zellen zeigen eine deutlich erhöhte Fluoreszenz Albumin-produzierender Zellen im eCFP-Kanal (grün). **B** An Tag 0 (d0, undifferenziert), Tag 10 (d10) und Tag 15 (d15) des Differenzierungsprotokolls wurde zusätzlich Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR die Expression des endogenen Albumingens bzw. des eCFP-Gens überprüft. Spur 1 zeigt jeweils das Ergebnis der RT-PCR, Spur 2 das Resultat der PCR aus der RT-Negativkontrolle. +: Positivkontrolle mit cDNA aus Lebergewebe bzw. Vektor-DNA als Matrize. -: Wasserkontrolle.

Auch hier ergibt die RT-PCR mit den eCFP-spezifischen Primern bereits in undifferenzierten Zellen ein Signal, welches in seiner Intensität nicht mit der Aktivität des endogenen ALB-Promotors zu korrelieren scheint (Abbildung 30B).

Weder eine der mittels retroviraler Transfektion (n=4) noch eine der durch Elektroporation (n=6) erzeugten Zelllinien, die das G6P-DsRed2-Reporterkonstrukt tragen, zeigt eine gegenüber der WT-Kontrolle erhöhte Fluoreszenz Albumin-positiver Zellen nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls (Abbildung 31A). Die Detektion von spezifischen Fluoreszenzsignalen wird dabei jedoch durch eine starke Eigenfluoreszenz verschiedener Strukturen innerhalb der EBs beeinträchtigt.



B CGR8_pROSA_G6P-DsRed2



C CGR8_pQG6P-DsRed2

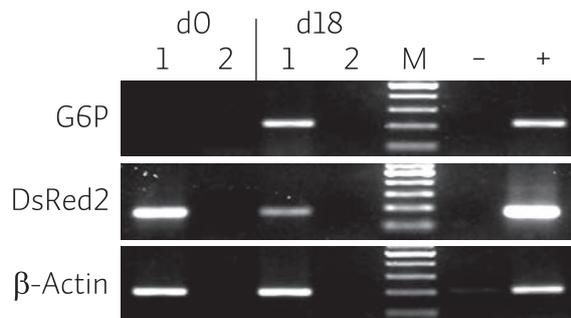


Abbildung 31: Reporter-Expression in G6P-DsRed2-transgenen ES-Zellen. **A** Konfokale Fluoreszenzmikroskopie G6P-DsRed2-transgener ES-Zellen nach Abschluss des EB-basierten Differenzierungsprotokolls. Die Zellen wurden an Tag 18 des Differenzierungsprotokolls fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung Albumin-positiver Zellen durchgeführt (grün). Weder die durch retroviralen Gentransfer (CGR8_pQG6P-DsRed2) noch die durch Elektroporation des pROSA-basierten Reporterkonstruktes (CGR8_pROSA_G6P-DsRed2) erzeugten Zellen zeigten eine erkennbare DsRed2-Fluoreszenz Albumin-produzierender Zellen. **B+C** Ergebnis der RT-PCR mit G6Pase- bzw. DsRed2-spezifischen Primern aus polyA-RNA undifferenzierter Zellen (**d0**) und nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls (**d18**). Spur **1** zeigt das Ergebnis der PCR nach cDNA-Synthese, Spur **2** das Resultat der RT-Negativ-Kontrolle. - : Wasserkontrolle; + : Positivkontrolle mit cDNA aus Lebergewebe bzw. Vektor-DNA als Matrize.

Auf RNA-Ebene zeigt sich für die pROSA-G6P-DsRed2-PGK-ZeoR-transgene Zelllinie dabei ein ähnliches Bild wie im Falle der beiden anderen Reporterkonstrukte. Ebenfalls kann hier bereits in

der RNA undifferenzierter Zellen eine DsRed2-spezifische Sequenz nachgewiesen werden. Das Signal nimmt wiederum nach Differenzierung der Zellen nicht erkennbar zu (Abbildung 31B). Im Falle der durch Infektion mit dem G6P-DsRed2-Virus erzeugten Zelllinie kommt es nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls sogar zu einem Rückgang des DsRed2-spezifischen Signals (Abbildung 31C).

IV.3.6 Zwischenzusammenfassung 2

Um ein System zur Identifizierung und Isolierung erfolgreich differenzierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Differenzierungsprozesses zu erzeugen, wurden regulatorische Elemente dreier entwicklungspezifischer Gene (*Ttr*, *Alb*, *G6p*) vor die kodierenden Sequenzen von Fluoreszenzprotein-Genen gesetzt. Es wurde versucht, diese Reporter-kassetten auf unterschiedlichen Wegen stabil in das Genom undifferenzierter ES-Zellen zu integrieren.

Zum einen wurden die Kassetten in retrovirale Expressionsvektoren gesetzt. Mit diesen wurden infektiöse rekombinante Viruspartikel erzeugt, mit denen im Anschluss ES-Zellen infiziert wurden. Die Titer der erzeugten Virenpräparationen waren trotz einer erfolgreichen Konzentrierung mittels PEG-Fällung sehr gering. Nur im Falle des G6P-DsRed2-Konstruktes konnten auf diese Weise stabil transfizierte Zelllinien generiert werden. Die Zellen zeigten jedoch keine erkennbare Synthese des Fluoreszenzproteins nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls.

Zum anderen wurde versucht, die Reporter-konstrukte mittels homologer Rekombination gezielt in den ROSA26-Lokus zu integrieren. Auf diese Weise konnte eine ganze Reihe transgener Zelllinien erzeugt werden, welche die gewünschten Expressionskassetten stabil integriert hatten. Im Falle des ALB-eCFP-Konstruktes konnte so eine Zelllinie erzeugt werden, die eine spezifische Synthese des Reporterproteins in Albumin-produzierenden Zellen zeigt. Die anderen beiden Konstrukte zeigten in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie keine erhöhte Fluoreszenz nach Differenzierung. Zumindest bei den Zellen, die das TTR-nucGFP-Konstrukt tragen, lässt sich mittels Durchflusszytometrie jedoch eine wenn auch schwache Synthese des GFP darstellen.

v Diskussion

Die *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus stellt ein neues System dar, um mehr über die molekularen Vorgänge während der Organogenese der Leber und der Bildung reifer Hepatozyten bei Säugetieren zu lernen. Gerade der Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren lässt sich relativ einfach untersuchen. Auch die Durchführung von Studien zur Identifizierung und Charakterisierung differenziell exprimierter Gene während des Differenzierungsprozesses können einen weiteren Aufschluss über die komplexen Vorgänge bei der Organogenese der Leber liefern. Dabei ist die *in vitro*-Differenzierung für genetische Manipulationen ein leicht zugängliches System, das den Einsatz zeit- und kostenintensiver Tierexperimente zumindest teilweise ersetzen kann. Voraussetzung hierfür sind neben möglichst effektiven Differenzierungsprotokollen allerdings Methoden, die eine unkomplizierte Analyse des Differenzierungsvorgangs ermöglichen. Zudem bedarf es Verfahren, die eine Isolierung erfolgreich differenzierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Differenzierungsprozesses gestatten.

V.1 Etablierung und Optimierung des Differenzierungsprotokolls

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein System im Labor etabliert, das eine möglichst effektive Generierung von hepatozytenähnlichen Zellen aus murinen ES-Zellen erlauben sollte. Hierfür wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf den Differenzierungsprozess untersucht und es wurde versucht, neue Erkenntnisse über die *in vitro*-Differenzierung muriner ES-Zellen zu berücksichtigen.

V.1.1 Der Zeitpunkt der Zugabe externer Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren beeinflusst die Expression leberspezifischer Markergene und bedarf einer Anpassung an die verwendete Zelllinie

Das im Zuge dieser Arbeit vornehmlich zum Einsatz gekommene Differenzierungsprotokoll beruht auf einer durch die Zugabe externer Faktoren unterstützten Differenzierung der ES-Zellen über den Schritt der EB-Bildung und basiert auf dem im Jahre 2001 veröffentlichten Protokoll von Takashi Hamazaki et al. (Hamazaki et al., 2001; Abbildung 7). Zwar scheint die Zugabe externer Faktoren für eine Generierung von hepatozytenähnlichen Zellen aus ES-Zellen nicht unbedingt nötig zu sein, sie führt aber zu einer beschleunigten und verstärkten Expression leberspezifischer Gene (Yamada et al., 2002; Miyashita et al., 2002; Asahina et al., 2004; Hu et al., 2004; Kumashiro et al., 2005; Ogawa et al., 2005).

In vivo kommt es während der Organogenese der Leber zu einem komplizierten Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Signale (siehe Abschnitt I.2). Dabei sind sowohl die zeitliche als auch die räumliche Koordination der Signale und daraus entstehende lokale Konzentrationsunterschiede für das weitere Schicksal der Zellen von entscheidender Bedeutung. Auch die *in vitro*-Differenzierung von ES-Zellen zu Hepatozyten in EBs ist ein komplexer Vorgang, bei dem es zu einer Reihe scheinbar essentieller Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen in der Kultur entstehenden Zellpopulationen kommt (Ogawa et al., 2005). Es liegt somit nahe, dass auch hier der Zeitpunkt externer Signale eine entscheidende Rolle spielt. Vergleicht man die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, so zeigt sich, dass trotz ähnlicher Differenzierungsprotokolle der Zeitpunkt, an dem ein bestimmter Marker nachgewiesen werden kann, oft deutlich variiert. Dies lässt sich zum einen sicherlich über eine unterschiedliche Sensitivität der Nachweismethoden erklären, ist aber zum anderen vermutlich auch auf Unterschiede in den verwendeten ES-Zelllinien zurückzuführen. Nimmt man diese Gründe zusammen, so wird deutlich wie wichtig eine Anpassung

gerade des zeitlichen Ablaufs eines Differenzierungsprotokolls bei dessen Etablierung im eigenen Labor ist.

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass es bereits an Tag 8 des Differenzierungsprotokolls zu einer Expression früher leberspezifischer Gene kommt (IV.2.1.1, Abbildung 12). Die Spezifizierung entodermaler Zellen in Richtung Hepatogenese beginnt also schon vor dem 8. Tag. Da dieser Prozess *in vitro* durch die Zugabe von FGF-1 zum Medium unterstützt werden soll, macht es Sinn, hiermit bereits vor diesem Zeitpunkt zu beginnen. Nachdem FGF-1 keinen negativen Einfluss auf die Bildung von EBs hatte (nicht gezeigt), wurde, um möglichst viele Zellen zu erreichen, bereits an Tag 2 mit der Zugabe von FGF-1 begonnen. Entsprechend wurde auch die erste Gabe von HGF auf den 10. Tag des Protokolls vorgezogen, um möglichst früh die Proliferation und Differenzierung entstehender Hepatoblasten zu unterstützen. Wie erhofft, kommt es nach der Anpassung des Differenzierungsprotokolls zu einer verstärkten Expression sämtlicher getesteter Markergene (Abbildung 13). Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings beachtet werden, dass die gesteigerte Expression leberspezifischer Gene nicht unbedingt bedeuten muss, dass einer der Differenzierungsprozesse effektiver abläuft. Der beobachtete Effekt könnte auch durch eine früher einsetzende Differenzierung hervorgerufen worden sein. Die Hepatozyten-Vorläufer hätten dann lediglich mehr Zeit zu proliferieren und würden somit zu einem stärkeren Signal in der RT-PCR führen. Der Unterschied in der Expressionssteigerung der einzelnen Gene lässt sich so jedoch nicht erklären. Die Ergebnisse verdeutlichen auf jeden Fall, dass der Zeitpunkt der Faktorzugabe einen nicht unerheblichen Einfluss auf den Differenzierungsprozess hat. In diesem Zusammenhang sind möglicherweise auch die Versuchsergebnisse der Experimente zu sehen, die die Auswirkung von FGF-4 auf den Differenzierungsprozess untersuchen sollten.

V.1.2 Der positive Effekt von FGF-4 auf die Entstehung hepatozytenähnlicher Zellen bei Differenzierung in Monolayer-Kultur lässt sich nicht ohne Weiteres auf EB-basierte Protokolle übertragen

Bei einem Differenzierungsprotokoll, welches eine Erzeugung hepatozytenähnlicher Zellen aus ES-Zellen in *Monolayer*-Kultur erlaubt, zeigt FGF-4 neben FGF-1 und HGF einen deutlichen Effekt bei der Spezifizierung der Zellen (Teratani et al., 2005). Gibt man FGF-4 aber während der Differenzierung in EBs zum ungefähren Zeitpunkt der Spezifizierung (d5–10) zum Kulturmedium,

so scheint die Entstehung hepatozytenähnlicher Zellen um ein Vielfaches ineffizienter abzulaufen (IV.2.1.2, Abbildung 14). Das muss allerdings nicht zwangsläufig heißen, dass FGF-4 in EB-basierten Protokollen keinen positiven Einfluss haben kann. Für die Wirkung vieler Faktoren gibt es während des Differenzierungsprozesses enge Zeitfenster. So kann ein und derselbe Faktor abhängig vom Zeitpunkt und der Konzentration, mit der dieser verabreicht wird, zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen führen. Dies wird in ganz extremem Maße deutlich, betrachtet man die unterschiedlichen Effekte von all-*trans*-Retinsäure auf die *in vitro*-Differenzierung von ES-Zellen, die in EB-basierten Protokollen zur Generierung von Derivaten aller drei Keimblätter eingesetzt wird (Rohwedel et al., 1999; Micallef et al., 2005). Auch ist denkbar, dass der zwar vorhandene positive Einfluss auf die Spezifizierung entodermaler Zellen durch einen überwiegenden negativen Effekt aufgehoben wird. FGF-4 könnte die Entstehung anderer Zellpopulationen beeinflussen, was zum Fehlen eines anderen benötigten Stimulus oder zum Auftreten eines zusätzlichen hemmenden Signals führen könnte. Nichtsdestotrotz besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den in *Monolayer*-Kultur erzielten Ergebnissen um ein Artefakt handelt, das weder während der Organogenese der Leber *in vivo* noch bei der Differenzierung in EBs eine Rolle spielt.

Der Einfluss von LIF und RS auf die Entstehung entodermaler Zellen in *Monolayer*-Kultur bestätigt die Bedeutung von RS im beschriebenen Differenzierungsprotokoll (Teratani et al., 2005). Allerdings wird deutlich, dass der erste Schritt des Protokolls – die Erzeugung entodermaler Zelltypen – möglicherweise noch verbessert werden kann. Da die Optimierung jedoch ausschließlich auf die Expression des Transthyretins ausgerichtet war, welche für die unter IV.3.5 beschriebenen Versuche an pROSA26_TTR-nucGFP-transgenen ES-Zellen erforderlich war, kann von diesen Daten nicht direkt auf den Einfluss der Faktoren auf die Entstehung entodermaler Zellen geschlossen werden.

V.1.3 Unterschiede im verwendeten Kälberserum beeinflussen den Differenzierungsprozess und reduzieren somit die Aussagekraft erzielter Ergebnisse

Dass auch Faktoren aus dem in der Zellkultur verwendeten Serum den Differenzierungsprozess embryonaler Stammzellen beeinflussen, ist hinreichend dokumentiert. Schon die Kultivierung der

Zellen in ihrem undifferenzierten Zustand ist abhängig von der verwendeten Serumcharge. Entscheidend, wenn auch vermutlich nicht ausschließlich, ist hierbei das Vorhandensein von BMPs im Serum, die eine Entstehung neuronaler Zellen verhindern (Ying et al., 2003) und nach dem Entzug von LIF eine Differenzierung zu mesodermalen Zellen unterstützen (Johansson und Wiles, 1995; Wiles und Johansson, 1999; siehe auch Abschnitte I.3 und I.4). Schon früh sind also Faktoren aus dem Serum an Prozessen beteiligt, die das spätere Schicksal der Zellen beeinflussen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen somit auch die Versuche von Atsushi Kubo und Mitarbeitern, die durch einen zeitlich begrenzten Serumentzug eine vermehrte Entstehung entodermaler Zellen in EBs erreichten (Kubo et al., 2004). Im Zuge der Etablierung und Optimierung des EB-basierten Differenzierungsprotokolls wurde deshalb der Einfluss des Serums auf die Entstehung hepatozytenähnlicher Zellen genauer untersucht. Hierfür wurde versucht, die Ergebnisse von Kubo und Mitautoren (Kubo et al., 2004) im Protokoll zu berücksichtigen. Zudem wurde der Einfluss unterschiedlicher Serum-Präparationen auf den Differenzierungsprozess überprüft.

Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten führte der Serumentzug zwischen Tag 2,5 und Tag 6 zu einer deutlich verringerten Expression des Albumingens an Tag 10 des Differenzierungsprotokolls (IV.2.1.3.1, Abbildung 15). Zum einen spiegelt dies möglicherweise die Beobachtung wider, dass sich unterschiedliche ES-Zelllinien bei der *in vitro*-Differenzierung trotz identischer Kultivierungsbedingungen unterschiedlich verhalten können (Ward et al., 2004). Zum anderen ist es aber vielleicht auch ein Hinweis auf die Bedeutung der verwendeten Serumcharge. Verschiedene Serumpräparationen unterscheiden sich häufig deutlich in ihrer Zusammensetzung und der Konzentration enthaltener Faktoren und haben dadurch vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen. Das von Kubo *et al.* verwendete Serum (Kubo et al., 2004) enthielt möglicherweise eine höhere Konzentration eines Faktors, der die Differenzierung in Richtung entodermaler Zellen beeinträchtigte: Dies ist vermutlich der Grund, weshalb ein temporärer Entzug des Serums einen positiven Einfluss auf die Zelldifferenzierung hatte. Das in dieser Arbeit eingesetzte FCS weist vielleicht eine relativ geringe Menge des entsprechenden Faktors auf oder enthält wiederum mehr von einem zweiten Molekül mit gegenteiligem Effekt. Die entscheidende Bedeutung des verwendeten Serums wird deutlich, betrachtet man die Ergebnisse des Differenzierungsprotokolls mit den unterschiedlichen Serumpräparationen. Trotz ansonsten identischer Kultivierungsbedingungen führt der Austausch des Serums durch eine andere

Serumcharge zu einem drastischen Rückgang fast sämtlicher Differenzierungsmarker (IV.2.1.3.2, Abbildung 16). Dabei ist allerdings unklar, ob der Effekt direkt durch einen Einfluss des Serums auf die Differenzierung der ES-Zellen zu Hepatozyten oder indirekt z.B. durch die geringere Effizienz der Entstehung kardialer Vorläuferzellen in der Kultur hervorgerufen wird. Letztere scheint von nicht unerheblicher Bedeutung für die Entstehung von hepatozytenähnlichen Zellen bei der *in vitro*-Differenzierung von ES-Zellen zu sein (Ogawa et al., 2005).

Einzig und allein Transthyretin als früher entodermaler Marker scheint vermehrt gebildet zu werden. Dies steht jedoch im Gegensatz zu der reduzierten Expression des α -1-Antitrypsin-Gens, dem zweiten entodermalen Markergen. Eine genaue Deutung dieses Ergebnisses würde allerdings weitere Untersuchungen erfordern. Die Ergebnisse veranschaulichen ein weiteres großes Problem vieler Differenzierungsstudien: die Charakterisierung und Identifizierung entstandener Zellpopulationen anhand eines relativ kleinen Satzes mehr oder weniger spezifischer Marker (siehe auch Abschnitt I.4.1). So lassen die hier gewählten Marker keine Unterscheidung zwischen embryonalem und extraembryonalem Entoderm zu. Auch muss man bei der Interpretation der Ergebnisse vorsichtig sein, die eine verstärkte *G6p*-Expression durch anschließende Kultivierung der Zellen in mit NCS supplementiertem Medium zeigen (Abbildung 17). Da um den Zeitpunkt der Geburt die *G6p*-Expression in der Leber um ein Vielfaches zunimmt, könnte die erhöhte RNA-Menge zwar leicht als eine zusätzliche Reifung der Hepatozyten gedeutet werden, jedoch wird die Expression des Gens in Abhängigkeit des Nährstoffangebotes von verschiedenen Hormonen, wie Glukagon (über cAMP), Glukokortikoiden und Insulin reguliert (Argaud et al., 1996; Schmoll et al., 1996; Streeper et al., 1997; Schmoll et al., 1999; Vander Kooi et al., 2003). Die beobachtete Expressionssteigerung könnte somit lediglich auf einer unterschiedlichen Konzentration der Hormone in den verschiedenen Seren beruhen. Zudem wird das Gen ab einem Zeitpunkt kurz vor der Geburt neben der Leber auch noch in der Niere und dem Darm exprimiert (Pan et al., 1998). Trotzdem macht auch dieses Ergebnis deutlich, dass die für die *in vitro*-Differenzierung verwendete Serumpräparation einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis haben kann und somit die Aussagekraft vieler Arbeiten möglicherweise relativiert.

V.2 Generierung eines Systems zu Visualisierung und Selektionierung hepatischer Vorläuferzellen

Da weder reife Hepatozyten noch deren Vorläuferzellen spezifische Oberflächenmarker besitzen, sollte ein System geschaffen werden, das die zell- und entwicklungsspezifische Expression von Reportergenen in differenzierenden ES-Zellen ermöglicht. Hierfür wurden die regulatorischen Elemente verschiedener Differenzierungsmarker ausgewählt, vor unterschiedliche Reportergene gesetzt und stabil in das Genom undifferenzierter ES-Zellen integriert.

V.2.1 Funktionalität der ausgewählten regulatorischen Elemente

Sowohl das gewählte TTR- als auch das verwendete G6Pase-Promotor-Konstrukt zeigen bei transienter Transfektion stabiler Zelllinien die erwartete Spezifität (IV.3.1, Abbildung 19). Beide Konstrukte zeigen eine deutliche Aktivität in den beiden Hepatomzelllinien HepG2 und HuH-7, führen aber zu keiner Transkription nachgeschalteter Leserahmen in Zellen nicht-hepatischen Ursprungs. Im Gegensatz dazu zeigt das ALB-Promotor/Enhancer-Konstrukt auch in allen anderen getesteten Zelllinien eine deutliche Aktivität. Diese eingeschränkte Spezifität bei transienter Transfektion stabiler Zelllinien wurde allerdings bereits von einer anderen Gruppe beobachtet (Quinn et al., 2000) und steht somit scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen in transgenen Mäusen (Pinkert et al., 1987; Herbst et al., 1989; Bürckstümmer, 2005). Beachtet man jedoch, dass Gene innerhalb eines chromosomalen Kontextes einer Reihe zusätzlicher Regulationsmechanismen unterliegen, ist ein solches Ergebnis nicht weiter überraschend. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen immer deutlicher, dass epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen – vor allem auch während der Differenzierung von Zellen – entscheidend an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Wu und Sun, 2006). Zieht man nun die Bedeutung von HNF-3 und GATA-4 bezüglich der Expression des Albumingens während der Organogenese der Leber in Betracht und deren Fähigkeit, ihre Erkennungssequenzen auch in kondensiertem Chromatin zu binden – und dabei zu einer Öffnung der Chromosomenstruktur beizutragen (siehe Abschnitt I.2.1) –, liegt es nahe, dass Chromatin-vermittelte Mechanismen entscheidend an der Kontrolle des Albumin-Promotors beteiligt sind. Da diese bei transienter Transfektion jedoch nicht greifen können, führt das möglicherweise zu der beobachteten Aktivität des Reporterkonstruktes in Zellen nicht-hepatischen Ursprungs.

V.2.2 Herstellung transgener ES-Zellen mittels MMLV-basiertem retroviralem Gentransfer

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien steht eine Vielzahl an Verfahren zur Verfügung. Der retrovirale Gentransfer bietet hier verschiedene Vorteile. Für gewöhnlich erreicht man eine hohe Transfektionseffizienz, und die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer stabilen Integration des gesamten gewünschten Abschnitts in das Empfänger-genom kommt, ist hoch. Nicht zuletzt bietet die Methode die Möglichkeit, die Anzahl der Integrate über den Einsatz der Viren in einer definierten MOI zumindest teilweise zu kontrollieren. Durch den Einsatz interner Promotoren konnte bereits Ende der 1980er Jahre sowohl eine ubiquitäre (Stewart et al., 1987) als auch eine zellspezifische Expression (Soriano et al., 1986) nachgeschalteter Gene in durch Infektion von Präimplantationsembryonen erzeugten transgenen Mäusen erzielt werden.

V.2.2.1 Die Transfektion der klonierten Expressionsplasmide in die Verpackungszelllinie führt zu relativ niedrigen Virentitern im Überstand

Betrachtet man die durchschnittlichen Titer der erzeugten Reporterviren (TTR-nucGFP-, ALB-eCFP- bzw. G6P-DsRed2-Virus) oder des CAG-eCFP-Kontroll-Virus, liegen diese zwischen einem Faktor von 10 und 200 unter denen des CMV-eCFP-Virus (IV.3.2.2). Im Falle der besonders niedrigen Titer, welche nach Transfektion der Vektoren pQTTR-nucGFPIP_PGK-ZeoR und pQALB-eCFPIH_PGK-ZeoR erzielt wurden, spielt sicherlich die Größe der Inserts eine entscheidende Rolle, die beide mit etwa 6,2 kb im Bereich der maximalen Kapazität der Vektoren von ca. 6,5 kb liegen (Angabe des Herstellers). Im Falle des G6P-DsRed2- und des CAG-eCFP-Virus ist es allerdings unwahrscheinlich, dass es aufgrund der Größe zu einem ineffizienten Verpacken des retroviralen Transkripts kommt. Vor allem der direkte Vergleich der beiden Kontroll-Viren (CMV-eCFP-Virus, CAG-eCFP-Virus) legt nahe, dass der interne Promotor einen direkten Einfluss auf den erzielten Virustiter hat. Abweichungen im Virustiter bei Verwendung unterschiedlicher interner Promotoren wurden bereits früher beschrieben (Guild et al., 1988).

V.2.2.2 Eine Reihe von Faktoren verhindert die effiziente Erzeugung der transgenen Zelllinien durch retroviralen Gentransfer

Die Infektion undifferenzierter ES-Zellen mit den erzeugten Kontroll-Viren (CAG-eCFP-Virus bzw. CMV-eCFP-Virus) funktioniert, verläuft aber äußerst ineffizient (IV.3.2.4, Abbildung 24). Ein entscheidender Faktor dabei ist sicherlich die Verkürzung der Inkubationszeit der ES-Zellen mit den virushaltigen Überständen von über 12 Stunden (bei der Titerbestimmung auf NIH3T3-Zellen) auf ca. 2 Stunden. In dieser kurzen Zeit kann nur ein kleiner Teil der infektiösen Viruspartikel an die Zellen binden (Wang et al., 1991b). Dies erklärt jedoch noch nicht, warum bei Infektion der ES-Zellen mit den retroviralen Reporterkonstrukten keine bzw. nur so wenige transgene Klone generiert werden konnten (IV.3.2.5). Bei der beobachteten Effizienz von nur 5 % sollte dies selbst bei einem Titer von $3 \cdot 10^3$ Viren/ml Infektionsmedium - wie bei dem ALB-eCFP-Reportervirus vorlag – zur Entstehung von ca. 150 resistenten Kolonien führen. Vielmehr wird hierbei eines der größten Probleme des retroviralen Gentransfers in embryonale Stammzellen deutlich: Das *silencing* retroviraler Integrate in Stammzellen. Schon 1977 wurde beschrieben, dass es kurz nach der Infektion pluripotenter embryonaler Karzinomzellen (EC-Zellen) zu einer vollständigen Hemmung der retroviralen Transkription kommen kann (Teich et al., 1977). Auch wurde beobachtet, dass die Expression von integrierten Proviren bei identischen Tochterzellen stark variieren kann, ein Phänomen, das unter dem Begriff *variegation* bekannt ist (Swindle et al., 2004; Yao et al., 2004). Betroffen sind dabei neben EC- und ES-Zellen (Teich et al., 1977; Stewart et al., 1982; Kempler et al., 1993; Haas et al., 2003) auch Präimplantationsembryonen (Jahner et al., 1982; Jaenisch et al., 1982) und hämatopoetische Stammzellen (Bowtell et al., 1988; Challita und Kohn, 1994; Klug et al., 2000; Haas et al., 2003). Auslöser hierfür sind verschiedene Sequenzelemente, die sich bei MMLV vor allem im Bereich der *long terminal repeats* (LTRs) befinden. Trotz der selbstinaktivierenden Eigenschaft der verwendeten Retro-X™ Q-Vektoren bleiben bei diesen nach der Integration des Provirus die so genannte *negative control region* (NCR) und die innerhalb der für die Replikation benötigten *primer binding site* (PBS) gelegene *repressor binding site* (RBS) erhalten. Der Einsatz interner Promotoren kann dabei zwar zu einer Expression nachgeschalteter Gene in ansonsten nicht permissiven Zellen führen (Guild et al., 1988; Hawley et al., 1989a; Hawley et al., 1989b; Rubenstein et al., 1984), der transkriptionsreprimierende Effekt beschränkt sich jedoch nicht auf den innerhalb der 5'LTR-gelegenen viralen Promotor, sondern beeinflusst auch interne

Promotoren (Bowtell et al., 1988; Petersen et al., 1991; Kempler et al., 1993; Modin et al., 2000; Haas et al., 2003). Dabei scheinen mehrere epigenetische Mechanismen eine Rolle zu spielen, die in der Bildung repressiver, kondensierter Chromatinstrukturen resultieren (zusammengefasst in: Ellis und Yao, 2005). Schon etwa 48 Stunden nach Infektion kommt es zu einem frühen, von einer Methylierung der DNA unabhängigen Block, nach einigen weiteren Tagen scheinen dann auch methylierungsabhängige Prozesse eine Rolle zu spielen (Gautsch und Wilson, 1983; Niwa et al., 1983; Cherry et al., 2000; Pannell et al., 2000). Die Aufrechterhaltung des transkriptionsinaktiven Status erfolgt auch nach Differenzierung (*memory-* oder Gedächtnis-Effekt), ist jedoch methylierungsunabhängig (Yao et al., 2004). Hierzu passen auch die während dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bei der Infektion der ES-Zellen mit den rekombinanten MMLV-Partikeln. Der noch relativ hohe Anteil an eCFP-positiven Zellen ca. 48 Stunden nach Infektion der ES-Zellen mit den Kontrollviren beruht vermutlich auf einer Expression des Gens, bevor die frühen Mechanismen vollständig greifen. Die geringe Anzahl Zeocin-resistenter Kolonien spiegelt das eintretende *silencing* wieder. Ein Großteil der zunächst auftretenden Kolonien lässt sich jedoch nicht vermehren, was vermutlich auf den später einsetzenden methylierungsabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist. In Verbindung mit den geringen Titern an infektiösen Viruspartikeln führte das vermutlich dazu, dass sich mit den TTR-nucGFP-Viren und den ALB-eCFP-Viren keine transgenen Zelllinien etablieren ließen und nur vier Klone isoliert werden konnten, die das retrovirale G6P-DsRed2-Konstrukt stabil integriert hatten.

V.2.2.3 Die durch retroviralen Gentransfer erzeugten CGR8_pQG6P-DsRed2-ES-Zellen zeigen keine erkennbare Synthese des Fluoreszenzproteins

Trotz der stabilen Expression des Zeocinresistenzgens bei Langzeitkultivierung der Zellen in ihrem undifferenzierten Zustand kommt es nach Differenzierung der Zellen zu hepatozytenähnlichen Zellen zu keiner detektierbaren Synthese des Fluoreszenzproteins (IV.3.5, Abbildung 31A). Im einfachsten Falle reicht die Aktivität des G6Pase-Promotorkonstrukts in den erzeugten Zellen nicht aus, um bei Integration eines einzelnen Provirus zu einer ausreichend hohen Expression des Reportergens zu führen. Die transiente Transfektion verschiedener Hepatomzelllinien mit dem G6Pase-DsRed2-Reporterkonstrukt zeigt bereits, dass das Expressionsniveau des Konstruktes deutlich unter dem der anderen regulatorischen Elemente liegt (IV.3.1, Abbildung 19).

Jedoch könnten auch hier *Silencing*-Effekte wieder eine Rolle spielen. Mehrere Veröffentlichungen zeigen ein Ausschalten zuvor vorhandener retroviraler Genexpression bei Differenzierung pluripotenter Zellen (Niwa et al., 1983; Laker et al., 1998; Yao et al., 2004). Da es während der Differenzierung von Zellen zu erheblichen epigenetischen Modifikationen kommt (Wu und Sun, 2006) und dieser Effekt vor allem bei Proviren auftritt, die deutliche Schwankungen in ihrer Expression in undifferenzierten Zellen zeigen (*variegated viruses*; Yao et al., 2004), beruht dies möglicherweise auf einer „Umwandlung ihres Integrationsortes in Heterochromatin während des Differenzierungsschritts“ (Ellis und Yao, 2005). Um zu überprüfen, ob diese Mechanismen auch im vorliegenden Fall verantwortlich sind, wäre eine genaue Untersuchung der Expressionsstärke des PGK-Promotor-regulierten Zeocinresistenzgens hilfreich, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Effekt auf die beiden Transkriptionseinheiten unterschiedlich stark ausgeprägt sein könnte.

Der negative Einfluss der viralen *Silencer*-Elemente, vor allem der nahe der 5'LTR gelegenen RBS scheint sowohl von der Art des internen Promotors (Haas et al., 2003) als auch von dessen Entfernung (Kempner et al., 1993) abhängig zu sein. Damit wäre auch ein Mechanismus denkbar, bei dem es in den undifferenzierten ES-Zellen zu einem Umbau der Chromatinstruktur im Bereich des nahe der 5'LTR gelegenen G6Pase-Promotors kommt, der PGK-Promotor allerdings nicht in gleichem Maße betroffen ist. Dieser Zustand wird aufgrund des Gedächtniseffekts bei Differenzierung der Zellen aufrechterhalten und verhindert eine effiziente Expression des Fluoreszenzgens. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Fremd-DNA wie Reste bakterieller Plasmidrückräder (Townes et al., 1985), Selektionsmarker (Fiering et al., 1995) und Reportergene wie *lacZ* (Guy et al., 1996) und im speziellen auch *eGFP* (Dalle et al., 2005), ihre eigene sowie die Expression gekoppelter Gene negativ beeinflussen können. Es gibt somit eine ganze Reihe an Faktoren, die eine Expression des Reportergens in differenzierten ES-Zellen beeinträchtigen bzw. verhindern könnten und im Hinblick auf die geringe Effizienz der Generierung transgener ES-Zellen auf diesem Weg die Isolierung funktionaler Klone unwahrscheinlich machen.

Wie lassen sich aber die Ergebnisse der Reportergenexpression auf RNA-Ebene mit den Beobachtungen auf Fluoreszenzebene in Einklang bringen? Mittels RT-PCR lassen sich sowohl in undifferenzierten ES-Zellen als auch nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls DsRed2-spezifische RNA-Sequenzen nachweisen (IV.3.5, Abbildung 31C). Eine Erklärung wäre, dass es in

den ES-Zellen zu einer geringen unspezifischen Aktivität des G6Pase-Promotor-Konstrukts kommt. Diese könnte durch das Fehlen negativer regulatorischer Elemente hervorgerufen werden, die für eine hepatozytenspezifische Aktivität des Promotors benötigt werden. Dagegen sprechen jedoch die transienten Transfektionsversuche in Zellen nicht hepatischen Ursprungs (IV.3.1, Abbildung 19). Denkbar wären Einflüsse starker transkriptionsaktivierender Elemente (z.B. Enhancer) im Bereich des Integrationsortes. Auf eine Anwesenheit solcher Bereiche deutet möglicherweise die Tatsache hin, dass es zu keinem vollständigen *silencing* der Expression des Resistenzgens nach Integration des Provirus in das Genom kommt. Zudem integrieren MML-Viren bevorzugt in der Nähe transkriptionell erhöht aktiver Promotorregionen (Wu et al., 2003). Vielleicht kommt es auch trotz der selbstinaktivierenden Eigenschaft des retroviralen Konstrukts und der damit verbundenen Zerstörung des Enhancers zu einer geringen Transkription von dem in der LTR gelegenen Promotor. Das dadurch entstehende Transkript würde ebenfalls die Sequenzen des DsRed2-Leserahmens enthalten und für ein positives Signal in der RT-PCR sorgen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Integration des Provirus in ein Exon eines zellulären Gens stattgefunden hat. 34 % der nach Infektion von HeLa-Zellen mit pseudotypisierten Mausleukämieviren untersuchten Integrationsstellen liegen innerhalb bekannter Gene (Wu et al., 2003). Die mRNA des entsprechenden Gens würde dann ebenfalls die DsRed2-spezifischen Sequenzen beinhalten. Näheren Aufschluss würde hier eine detaillierte Expressionsanalyse mittels Northern-Blot oder die Sequenzierung der detektierten RNA ermöglichen. Der Rückgang des Signals nach Beendigung des Protokolls spricht auf jeden Fall für einen wie zuvor diskutierten positionsabhängigen Effekt durch epigenetische Modifikationen des Integrationsortes während der Differenzierung der Zellen.

V.2.3 Herstellung transgener ES-Zellen durch homologe Rekombination in den ROSA26-Lokus

Als eine alternative Methode zur Generierung transgener ES-Zellen wurde die homologe Rekombination der Reporter-kassetten in einen definierten Genort gewählt. Dadurch lassen sich positionsabhängige Effekte besser vorhersagen, und die Expression der einzelnen Klone sollte damit besser vergleichbar sein. Als Ziel wurde der ROSA26-Lokus gewählt (Friedrich und Soriano, 1991; Zambrowicz et al., 1997). Mit einem Spleiß-Akzeptor versehene Reportergene, die in diesen Lokus integriert werden, zeigen sowohl in ES-Zellen als auch in allen Geweben während der Embryogenese

sowie in der adulten Maus eine konstitutive Expression (Friedrich und Soriano, 1991; Zambrowicz et al., 1997; Soriano, 1999; Mao et al., 1999; Srinivas et al., 2001). Dies legt nahe, dass dieser Bereich während der Differenzierung von epigenetischen Modifikationen nicht betroffen ist. Der Locus ist mit Hinblick auf die Verhinderung positionsabhängiger epigenetischer Effekte damit eine interessante Option für die Insertion von gewebe- bzw. entwicklungsspezifisch exprimierten Reporterkonstrukten. Dabei muss allerdings darauf geachtet werden, dass die Konstrukte keine als Spleiß-Akzeptor funktionierenden Sequenzen aufweisen, um eine Expression der Reportergene vom ubiquitär aktiven ROSA26-Promotor zu verhindern. Um dies auszuschließen, wurde wenn möglich mit *Targeting*-Vektoren weitergearbeitet, die das Reporterkonstrukt in negativer Orientierung enthielten (IV.3.3.1, Abbildung 26).

V.2.3.1 Die homologe Rekombination der Reporterkonstrukte in den ROSA26-Lokus verläuft äußerst effizient

Die Generierung mehrerer transgener ES-Zelllinien erfordert ein System, welches eine effiziente Integration der gewünschten Sequenzen in das Empfängergenom ermöglicht. Die Insertion in den ROSA26-Lokus mit Hilfe des Vektors pROSA26-1 scheint dieses Kriterium zu erfüllen. Nach Elektroporation der drei Reporterkonstrukte konnte in allen Fällen eine große Anzahl Zeocin-resistenter Kolonien isoliert werden, von denen, abhängig von der Größe der Promotor/Enhancer-Konstrukte, zwischen 30 % und 45 % den vollständigen Sequenzbereich im Genom integriert hatten (IV.3.3.2, Abbildung 27). Dies bestätigt die auch von anderen Gruppen beschriebene hohe Effizienz der homologen Rekombination in den ROSA26-Lokus embryonaler Stammzellen (Soriano, 1999; Masui et al., 2005). Die Methode scheint somit ein System zu sein, welches eine relativ zügige Generierung multipler transgener Zelllinien mit identischem genetischem Hintergrund zulässt.

V.2.3.2 Die Integration der Expressionskassetten in den ROSA26-Lokus stellt ein viel versprechendes System zur gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression der Reportergene dar

Die Resultate der Untersuchung der Reporter-Expression in differenzierten ES-Zellen zeigen zunächst ein uneinheitliches und widersprüchliches Bild (IV.3.5). Betrachtet man zuerst die Ergebnisse auf Fluoreszenzebene, so scheint zumindest im Fall des ALB-eCFP-Konstrukts der Weg

über die homologe Rekombination in den ROSA26-Lokus geeignet zu sein, eine spezifische Expression des Reportergens zu erzielen. An Tag 15 des Differenzierungsprotokolls ist eine deutliche Synthese des eCFP-Proteins zu erkennen (Abbildung 30A). Die Gegenfärbung mit einem Mausalbumin-spezifischen Antiserum zeigt zudem, dass die Synthese nur in solchen Zellen stattfindet, die auch das endogene Albumin exprimieren. Die Unterschiede in der *eCFP*-Expression der getesteten Zelllinien lassen sich dabei leicht erklären. Bei Zelllinien, die keine Synthese des Fluoreszenzproteins zeigen, könnte es zu einer Mutation oder einer Deletion innerhalb des Konstruktes gekommen sein, welche nicht durch die Genotypisierung mittels PCR aufgedeckt werden kann. Der Unterschied in der Stärke der eCFP-Synthese zwischen den drei positiven Linien könnte darin liegen, dass es im Falle des am stärksten leuchtenden Klons zu einer Integration des Reporterkonstrukts in beide Allele des Lokus kam, während in den beiden anderen Linien nur eine Kopie der Reporter-kassette integriert wurde. Für eine Bestätigung dieser Theorie wäre eine genauere Genotypisierung der Zelllinien mittels Southern-Blot oder quantitativer PCR notwendig.

Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen anderer Gruppen, dass es bei Integration von vollständigen Expressionseinheiten in den Lokus zu einer zuverlässigen Expression der Gene sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten ES-Zellen kommt (Zheng et al., 2005). Dabei scheint ebenfalls die Regulierbarkeit der eingesetzten Promotoren erhalten zu bleiben, wie Versuche mit Tetracyclin-regulierbaren Systemen zeigen (Masui et al., 2005; Miyazaki et al., 2004; Miyazaki et al., 2005). Wieso aber ist nach stabiler Transfektion der anderen beiden Reporter-kassetten keine eindeutige Fluoreszenz differenzierter Zellen zu beobachten? Die FACS-Analyse nach Differenzierung der CGR8_pROSA_TTR-nucGFP-Zellen liefert hierfür möglicherweise die Antwort. Nach Differenzierung der Zellen zu TTR-positiven Zellen scheint es durchaus zu einer Synthese des nucGFP-Proteins zu kommen, wie die Verschiebung der Fluoreszenzintensität einer Teilpopulation der Zellen entlang der X-Achse im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle verdeutlicht (Abbildung 29B). Diese ist jedoch nicht ausreichend, um eine Identifizierung der Zellen vor dem relativ hohen Hintergrund zu ermöglichen. Ein ähnliches Problem könnte auch bei den mit dem pROSA-G6P-DsRed2-PGK-ZeoR-Konstrukt stabil transfizierten Zellen vorliegen, zumal nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls eine Reihe an Strukturen existiert (einschließlich der Bereiche Albumin-produzierender Zellen), die eine sehr hohe Eigenfluoreszenz im roten Wellenlängen-Bereich aufweist (nicht gezeigt). Zieht man nun in Betracht, dass auch im Falle des

DISKUSSION

ALB-eCFP-Konstruktes nur einer der drei funktionalen Klone eine deutliche Fluoreszenz zeigt (siehe oben) und selbst diese noch relativ schwach ist, liegt das Problem vermutlich in der Expressionsstärke der Reporterstrukture. Um die Expression der Reportergene deshalb genauer zu charakterisieren, wurde zusätzlich zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und eine RT-PCR mit den Reporter-gen-spezifischen Primern durchgeführt (Abbildungen 29A, 30B und 31B). Dabei konnte allerdings selbst bei dem in der Fluoreszenzmikroskopie funktionalen CGR8_pROSA_ALB-eCFP-Klon keine Korrelation der Signalstärke mit dem Differenzierungszustand bzw. der Expression des endogenen Albumingens festgestellt werden. Vielmehr ergab die PCR bei allen Zelllinien bereits bei cDNA aus undifferenzierten Zellen ein deutliches Signal, das nach Differenzierung eher abnimmt anstatt stärker zu werden. Nun ist es vorstellbar, dass es bei allen Konstrukten zu einer schwachen unspezifischen Aktivität der Promotor-Konstrukte in undifferenzierten Zellen kommt. Die Immunfluoreszenzmikroskopie der pROSA26_ALB-eCFP-transgenen Zellen zeigt, dass nur einige wenige Zellen eine spezifische Expression des Fluoreszenzgens aufweisen. Die relativ unempfindliche Methode der semiquantitativen PCR kann diese zusätzliche Expression möglicherweise nicht auflösen. Das Signal in undifferenzierten Zellen ist jedoch so stark, dass man erwarten würde, die Expression der Reportergene auch in der Fluoreszenzmikroskopie detektieren zu können. Eine erhöhte Fluoreszenz undifferenzierter transgener ES-Zellen wurde jedoch nie beobachtet (nicht gezeigt). Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass das Signal nicht – zumindest nicht ausschließlich – auf einer Aktivität der in den ROSA26-Lokus integrierten Promotoren beruht. Dabei sind verschiedene Mechanismen vorstellbar, die zu einem Signal in der RT-PCR führen könnten. Möglicherweise beruht das Signal auf der Detektion noch nicht gespleißter RNA des ROSA26-Lokus. Die Polyadenylierung ist eng mit dem Spleißen vor allem der 3'-gelegenen Introns der prä-RNA verknüpft und kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* diesem vorausgehen (Niwa und Berget, 1991; Wetterberg et al., 1996; Bauren et al., 1998). Eine Detektion von Sequenzen innerhalb von Introns kann somit auch bei Verwendung von Oligo(dT)-Primern bei der reversen Transkription nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist für die Integrationsstelle in gegensätzlicher Richtung ein EST (*expressed sequence tag*) dokumentiert, was zu einer Verfälschung der Resultate in der RT-PCR führen könnte (Abbildung 32).

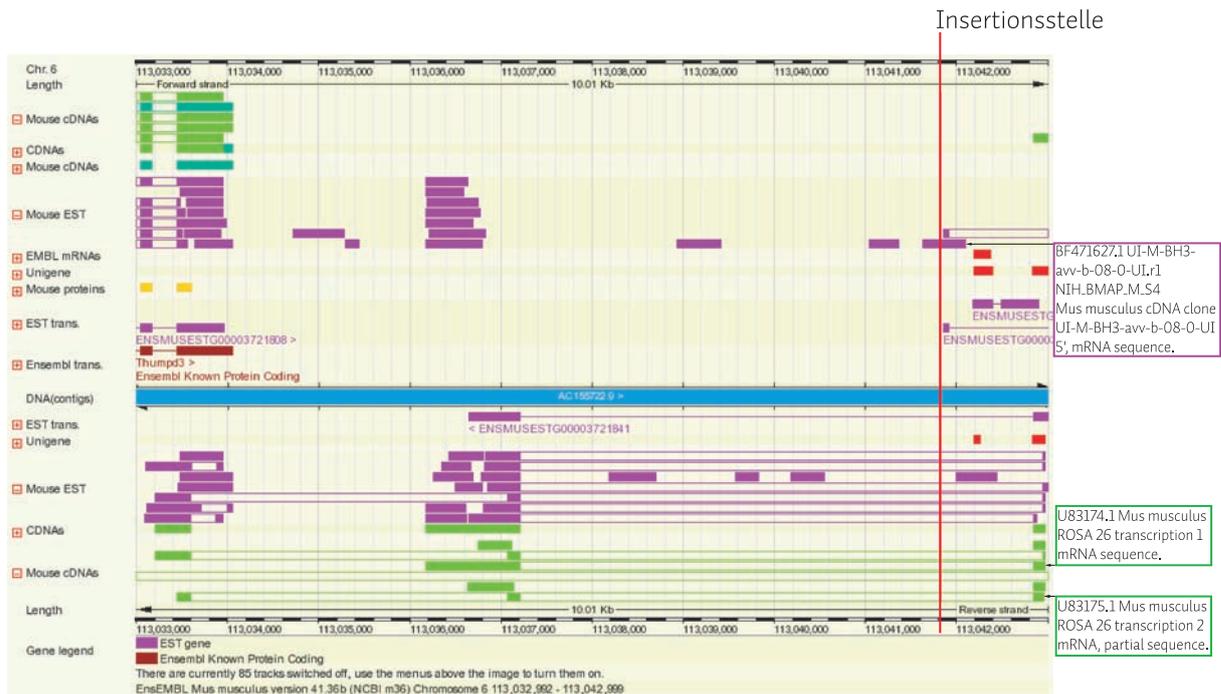


Abbildung 32: Genomische Umgebung des ROSA26-Lokus. Gezeigt ist die direkte Umgebung des Integrationsortes im ROSA26-Lokus (rote Linie). Die Karte enthält bekannte Gene (dunkelrot) sowie dokumentierte cDNAs (grün) und ESTs (lila). Markiert sind die Transkripte des ROSA26-Lokus und des ESTs, der mit der Insertionsstelle überschneidet (Ensembl Genome Browser, 2006).

Eine Klärung sollte mittels der Verwendung anderer Primer-Kombinationen in der RT-PCR oder über eine genauere Untersuchung der Transkripte mittels Northern-Blot und Sequenzierung möglich sein. Die Integration der Expressionskassetten in den ROSA26-Lokus könnte somit durchaus ein viel versprechendes System zur gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression der Reportergene darstellen, bedarf dabei aber noch einer genaueren Untersuchung und einer Optimierung der Reporterkonstrukte.

V.3 Ausblick

Obwohl die Differenzierung embryonaler Stammzellen *in vitro* viele Vorteile gegenüber der Untersuchung von Entwicklungsprozessen *in vivo* haben mag, bleibt sie ein äußerst komplexes System. Nur geringe Unterschiede in den Kultivierungsbedingungen oder bei den verwendeten Zelllinien können zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen führen und machen es schwer, die Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen zu vergleichen. Dabei wird immer deutlicher, welchen Einfluss das Serum auf den Differenzierungsprozess hat. Immer mehr Gruppen studieren deshalb in letzter Zeit serumbedingte Effekte (Kubo et al., 2004; Passier et al., 2005; Arufe et al., 2006; Taha et al., 2006).

DISKUSSION

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass es nicht nur eine Frage der An- oder Abwesenheit von Serum ist, sondern auch Chargenunterschiede eine erhebliche Rolle spielen können. Dies verdeutlicht umso mehr, wie wichtig die Entwicklung von Protokollen ist, die unter völlig definierten Bedingungen ablaufen. Während bei anderen Zelltypen hier inzwischen große Fortschritte gemacht wurden (Gissel et al., 2006; Bouhon et al., 2005; Ueno et al., 2006), sind auf dem Gebiet der *in vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten bis heute keine Ergebnisse veröffentlicht. Allerdings ermöglichen die hier gezeigten chargenabhängigen Unterschiede auch neue Wege. So wäre es interessant, die exakten Zusammensetzungen der verwendeten Serumpräparationen zu vergleichen. Auf diese Art gelingt es möglicherweise, die Anzahl relevanter Serumfaktoren stark einzuengen und neue Einsichten über den Einfluss des Serums zu gewinnen. Inwieweit die Entwicklung von Differenzierungsprotokollen in *Monolayer*-Kulturen zu einem besseren Verständnis der *in vivo*-Vorgänge beiträgt oder ob hier vielleicht zu oft Artefakte beobachtet werden, bleibt fraglich. Vielleicht könnte hier die begonnene Untersuchung des Einflusses von FGF-4, RS und LIF bei genauerer Analyse Anhaltspunkte liefern.

Eine große Hilfe könnte auch hierbei ein Reportersystem sein, wie es im Zuge dieser Arbeit zu etablieren versucht wurde. Die viel versprechenden Ergebnisse der pROSA26_ALB-eCFP-transgenen ES-Zellen zeigen, dass der hier gewählte Weg eine Möglichkeit bietet, relativ schnell zu weiteren transgenen Zelllinien zu gelangen, die eine zell- und entwicklungsspezifische Expression von Reporter genen aufweisen. Hierfür sollte jedoch erst genauer geklärt werden, was zu den Signalen in der RT-PCR führt. Um eine gesteigerte Expression der Reporter gene zu erreichen, könnte versucht werden, die Menge an bakteriellen Sequenzen in den Konstrukten zu reduzieren (Townes et al., 1985). Auch wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Intronsequenzen oft einen deutlichen positiven Einfluss auf die Expression von Genen haben kann (Brinster et al., 1988; Gruss et al., 1979; Gruss und Khoury, 1980). Bei Einfügen von Intronsequenzen und somit Spleiß-Akzeptoren muss dann allerdings eine negative Orientierung der Reporter konstrukte auf jeden Fall beachtet werden. Möglicherweise muss aber gerade im Falle des Reporter konstruktes für reife Hepatozyten der G6Pase-Promotor durch einen stärkeren Promotor ersetzt werden. Die Nützlichkeit solcher Reporter-Zelllinien wurde inzwischen bereits mehrfach auch im Bereich der *in vitro*-Differenzierung von ES-Zellen zu Hepatozyten gezeigt (Ishii et al., 2005; Teratani et al., 2005; Yamamoto et al., 2005). Ein System, welches die Identifizierung der Zellen in unterschiedlichen

Entwicklungsstadien vor einem gemeinsamen genetischen Hintergrund ermöglicht, existiert jedoch noch nicht.

Ein Schwerpunkt aller zukünftigen Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet sollte auf jeden Fall auch die Suche nach eindeutigen Differenzierungsmarkern sein. Dies ist unabdingbar, um eine vernünftige Deutung aller erzielten Ergebnisse zu ermöglichen.

VI Anhang

VI.1 Literaturverzeichnis

1. **Abe, K., Niwa, H., Iwase, K., Takiguchi, M., Mori, M., Abe, S.I., Abe, K., und Yamamura, K.I.** (1996). Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp. Cell Res.* **229**, 27-34.
2. **Ader, T., Norel, R., Levoci, L., und Rogler, L.E.** (2006). Transcriptional profiling implicates TGFbeta/BMP and Notch signaling pathways in ductular differentiation of fetal murine hepatoblasts. *Mech. Dev.* **123**, 177-194.
3. **Albritton, L.M., Tseng, L., Scadden, D., und Cunningham, J.M.** (1989). A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* **57**, 659-666.
4. **Altaba, A., Prezioso, V.R., Darnell, J.E., und Jessell, T.M.** (1993). Sequential expression of HNF-3 beta and HNF-3 alpha by embryonic organizing centers: the dorsal lip/node, notochord and floor plate. *Mech. Dev.* **44**, 91-108.
5. **Ang, S.L. und Rossant, J.** (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**, 561-574.

6. **Ang,S.L., Wierda,A., Wong,D., Stevens,K.A., Cascio,S., Rossant,J., und Zaret,K.S.** (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* **119**, 1301-1315.
7. **Anneren,C., Cowan,C.A., und Melton,D.A.** (2004). The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal. *J. Biol. Chem.* **279**, 31590-31598.
8. **Antoine,M., Wirz,W., Tag,C.G., Gressner,A.M., Wycislo,M., Muller,R., und Kiefer,P.** (2006). Fibroblast growth factor 16 and 18 are expressed in human cardiovascular tissues and induce on endothelial cells migration but not proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 224-233.
9. **Antoine,M., Wirz,W., Tag,C.G., Mavituna,M., Emans,N., Korff,T., Stoldt,V., Gressner,A.M., und Kiefer,P.** (2005). Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Growth Factors* **23**, 87-95.
10. **Argaud,D., Zhang,Q., Pan,W., Maitra,S., Pilkis,S.J., und Lange,A.J.** (1996). Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence. *Diabetes* **45**, 1563-1571.
11. **Arufe,M.C., Lu,M., Kubo,A., Keller,G., Davies,T.F., und Lin,R.Y.** (2006). Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into thyroid follicular cells. *Endocrinology* **147**, 3007-3015.
12. **Asahina,K., Fujimori,H., Shimizu-Saito,K., Kumashiro,Y., Okamura,K., Tanaka,Y., Teramoto,K., Arii,S., und Teraoka,H.** (2004). Expression of the liver-specific gene Cyp7a1 reveals hepatic differentiation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* **9**, 1297-1308.
13. **Ausubel,F.M.** (1997). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley.
14. **Battle,M.A., Konopka,G., Parviz,F., Gaggli,A.L., Yang,C., Sladek,F.M., und Duncan,S.A.** (2006). Hepatocyte nuclear factor 4{alpha} orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 8419-8424.
15. **Baughman,J.M. und Geijsen,N.** (2005). In vitro generation of germ cells: new techniques to solve current issues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1061**, 33-40.
16. **Bauren,G., Belikov,S., und Wieslander,L.** (1998). Transcriptional termination in the Balbiani ring 1 gene is closely coupled to 3'-end formation and excision of the 3'-terminal intron. *Genes Dev.* **12**, 2759-2769.

17. **Ben-Shushan,E., Thompson,J.R., Gudas,L.J., und Bergman,Y.** (1998). Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1866-1878.
18. **Ben-Ze'ev,A., Robinson,G.S., Bucher,N.L., und Farmer,S.R.** (1988). Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 2161-2165.
19. **Bort,R., Martinez-Barbera,J.P., Beddington,R.S., und Zaret,K.S.** (2004). Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* **131**, 797-806.
20. **Bort,R., Signore,M., Tremblay,K., Martinez Barbera,J.P., und Zaret,K.S.** (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev. Biol.* **290**, 44-56.
21. **Bossard,P. und Zaret,K.S.** (1998). GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* **125**, 4909-4917.
22. **Bottaro,D.P., Rubin,J.S., Faletto,D.L., Chan,A.M., Kmiecik,T.E., Vande Woude,G.F., und Aaronson,S.A.** (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**, 802-804.
23. **Bouhon,I.A., Kato,H., Chandran,S., und Allen,N.D.** (2005). Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in chemically defined medium. *Brain Res. Bull.* **68**, 62-75.
24. **Boustead,J.N., Stadelmaier,B.T., Eeds,A.M., Wiebe,P.O., Svitek,C.A., Oeser,J.K., und O'Brien,R.M.** (2003). Hepatocyte nuclear factor-4 alpha mediates the stimulatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) on glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription in H4IIE cells. *Biochem. J.* **369**, 17-22.
25. **Bowtell,D.D., Cory,S., Johnson,G.R., und Gonda,T.J.** (1988). Comparison of expression in hemopoietic cells by retroviral vectors carrying two genes. *J. Virol.* **62**, 2464-2473.
26. **Bradley,A., Evans,M., Kaufman,M.H., und Robertson,E.** (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-256.
27. **Brinster,R.L.** (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* **140**, 1049-1056.

28. **Brinster,R.L., Allen,J.M., Behringer,R.R., Gelinas,R.E., und Palmiter,R.D.** (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 836-840.
29. **Burch,H.B.** (1963). Biochemical changes in the perinatal rat liver. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **111**, 176-182.
30. **Burch,H.B., Lowry,O.H., Kuhlman,A.M., Skerjance,J., Diamant,E.J., Lowry,S.R., und von Dippe,P.** (1963). Changes in patterns of enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rat liver. *J. Biol. Chem.* **238**, 2267-2273.
31. **Bürckstümmer,T.** Identification of cellular targets of Hepatitis C Virus Non-structural Protein 5A. 2005. Freie Universität Berlin, Dissertation.
32. **Burdon,T., Stracey,C., Chambers,I., Nichols,J., und Smith,A.** (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **210**, 30-43.
33. **Burke,Z.D., Shen,C.N., Ralphs,K.L., und Tosh,D.** (2006). Characterization of liver function in transdifferentiated hepatocytes. *J. Cell Physiol* **206**, 147-159.
34. **Caron,J.M.** (1990). Induction of albumin gene transcription in hepatocytes by extracellular matrix proteins. *Mol. Cell Biol.* **10**, 1239-1243.
35. **Cartwright,P., McLean,C., Sheppard,A., Rivett,D., Jones,K., und Dalton,S.** (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885-896.
36. **Cascio,S. und Zaret,K.S.** (1991). Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development* **113**, 217-225.
37. **Cazillis,M., Rasika,S., Mani,S., Gressens,P., und Lelievre,V.** (2006). In vitro induction of neural differentiation of embryonic stem (ES) cells closely mimics molecular mechanisms of embryonic brain development. *Pediatr. Res.* **59**, 48R-53R.
38. **Challita,P.M. und Kohn,D.B.** (1994). Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2567-2571.
39. **Chambers,I., Colby,D., Robertson,M., Nichols,J., Lee,S., Tweedie,S., und Smith,A.** (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655.

40. **Chaya,D., Hayamizu,T., Bustin,M., und Zaret,K.S.** (2001). Transcription factor FoxA (HNF3) on a nucleosome at an enhancer complex in liver chromatin. *J. Biol. Chem.* **276**, 44385-44389.
41. **Cheng,A.M., Saxton,T.M., Sakai,R., Kulkarni,S., Mbamalu,G., Vogel,W., Tortorice,C.G., Cardiff,R.D., Cross,J.C., Muller,W.J. et al.** (1998). Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* **95**, 793-803.
42. **Cherry,S.R., Biniszkiewicz,D., van,P.L., Baltimore,D., und Jaenisch,R.** (2000). Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7419-7426.
43. **Chiba,H., Gotoh,T., Kojima,T., Satohisa,S., Kikuchi,K., Osanai,M., und Sawada,N.** (2003). Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **286**, 288-297.
44. **Chinzei,R., Tanaka,Y., Shimizu-Saito,K., Hara,Y., Kakinuma,S., Watanabe,M., Teramoto,K., Arii,S., Takase,K., Sato,C. et al.** (2002). Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* **36**, 22-29.
45. **Choi,D., Lee,H.J., Jee,S., Jin,S., Koo,S.K., Paik,S.S., Jung,S.C., Hwang,S.Y., Lee,K.S., und Oh,B.** (2005). In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body. *Stem Cells* **23**, 817-827.
46. **Chomczynski,P. und Sacchi,N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
47. **Chou,J.Y.** (1988). Regulators of fetal liver differentiation in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **263**, 378-386.
48. **Chung,S., Andersson,T., Sonntag,K.C., Bjorklund,L., Isacson,O., und Kim,K.S.** (2002). Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **20**, 139-145.
49. **Cirillo,L.A., Lin,F.R., Cuesta,I., Friedman,D., Jarnik,M., und Zaret,K.S.** (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* **9**, 279-289.
50. **Cirillo,L.A., McPherson,C.E., Bossard,P., Stevens,K., Cherian,S., Shim,E.Y., Clark,K.L., Burley,S.K., und Zaret,K.S.** (1998). Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J.* **17**, 244-254.

51. **Claus,P. und Grothe,C.** (2001). Molecular cloning and developmental expression of rat fibroblast growth factor receptor 3. *Histochem. Cell Biol.* **115**, 147-155.
52. **Clotman,F., Lannoy,V.J., Reber,M., Cereghini,S., Cassiman,D., Jacquemin,P., Roskams,T., Rousseau,G.G., und Lemaigre,F.P.** (2002). The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* **129**, 1819-1828.
53. **Coffinier,C., Gresh,L., Fiette,L., Tronche,F., Schutz,G., Babinet,C., Pontoglio,M., Yaniv,M., und Barra,J.** (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* **129**, 1829-1838.
54. **Coraux,C., Hilmi,C., Rouleau,M., Spadafora,A., Hinnrasky,J., Ortonne,J.P., Dani,C., und Aberdam,D.** (2003). Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr. Biol.* **13**, 849-853.
55. **Costa,R.H., Lai,E., und Darnell,J.E., Jr.** (1986). Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific. *Mol. Cell Biol.* **6**, 4697-4708.
56. **Costa,R.H., Lai,E., Grayson,D.R., und Darnell,J.E., Jr.** (1988). The cell-specific enhancer of the mouse transthyretin (prealbumin) gene binds a common factor at one site and a liver-specific factor(s) at two other sites. *Mol. Cell Biol.* **8**, 81-90.
57. **Costa,R.H., Van Dyke,T.A., Yan,C., Kuo,F., und Darnell,J.E., Jr.** (1990). Similarities in transthyretin gene expression and differences in transcription factors: liver and yolk sac compared to choroid plexus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 6589-6593.
58. **Courtois,G., Morgan,J.G., Campbell,L.A., Fourel,G., und Crabtree,G.R.** (1987). Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science* **238**, 688-692.
59. **Dalle,B., Rubin,J.E., Alkan,O., Sukonnik,T., Pasceri,P., Yao,S., Pawliuk,R., Leboulch,P., und Ellis,J.** (2005). eGFP reporter genes silence LCRbeta-globin transgene expression via CpG dinucleotides. *Mol. Ther.* **11**, 591-599.
60. **Denson,L.A., McClure,M.H., Bogue,C.W., Karpen,S.J., und Jacobs,H.C.** (2000). HNF3beta and GATA-4 transactivate the liver-enriched homeobox gene, Hex. *Gene* **246**, 311-320.
61. **Deutsch,G., Jung,J., Zheng,M., Lora,J., und Zaret,K.S.** (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* **128**, 871-881.

62. **DiPersio,C.M., Jackson,D.A., und Zaret,K.S.** (1991). The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4405-4414.
63. **Doetschman,T., Gregg,R.G., Maeda,N., Hooper,M.L., Melton,D.W., Thompson,S., und Smithies,O.** (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**, 576-578.
64. **Doetschman,T.C., Eistetter,H., Katz,M., Schmidt,W., und Kemler,R.** (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **87**, 27-45.
65. **Douarin,N.M.** (1975). An experimental analysis of liver development. *Med. Biol.* **53**, 427-455.
66. **Du,Z., Cong,H., und Yao,Z.** (2001). Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression-subtractive hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 701-706.
67. **Dufort,D., Schwartz,L., Harpal,K., und Rossant,J.** (1998). The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. *Development* **125**, 3015-3025.
68. **Duncan,S.A.** (2005). Generation of embryos directly from embryonic stem cells by tetraploid embryo complementation reveals a role for GATA factors in organogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1534-1536.
69. **Ellis,J. und Yao,S.** (2005). Retrovirus silencing and vector design: relevance to normal and cancer stem cells? *Curr. Gene Ther.* **5**, 367-373.
70. Ensembl Genome Browser . Chromosome 6; 113,033,000 - 113,043,000 - Detailed view. http://www.ensembl.org/Mus_musculus/contigview?c=6:113038000;w=10001;bottom=%7Cbump_cdna_update%3Aoff[e! Ensembl Mouse ContigView: Release 41]. 2006. 15-11-2006.
71. **Enzan,H., Himeno,H., Hiroi,M., Kiyoku,H., Saibara,T., und Onishi,S.** (1997). Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc. Res. Tech.* **39**, 336-349.
72. **Ernst,M., Gearing,D.P., und Dunn,A.R.** (1994). Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J.* **13**, 1574-1584.
73. **Ernst,M., Oates,A., und Dunn,A.R.** (1996). Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **271**, 30136-30143.

74. **Evans, M.J. und Kaufman, M.H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
75. **Fabregat, I., Sanchez, A., Alvarez, A.M., Nakamura, T., und Benito, M.** (1996). Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture. *FEBS Lett.* **384**, 14-18.
76. **Fair, J.H., Cairns, B.A., Lapaglia, M., Wang, J., Meyer, A.A., Kim, H., Hatada, S., Smithies, O., und Pevny, L.** (2003). Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery* **134**, 189-196.
77. **Fair, J.H., Cairns, B.A., Lapaglia, M.A., Caballero, M., Pleasant, W.A., Hatada, S., Kim, H.S., Gui, T., Pevny, L., Meyer, A.A. et al.** (2005). Correction of factor IX deficiency in mice by embryonic stem cells differentiated in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 2958-2963.
78. **Fassler, R. und Meyer, M.** (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* **9**, 1896-1908.
79. **Feng, Z., Srivastava, A.S., Mishra, R., und Carrier, E.** (2004). A regulatory role of Wnt signaling pathway in the hematopoietic differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1333-1339.
80. **Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D.I., Enver, T., Ley, T.J., und Groudine, M.** (1995). Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* **9**, 2203-2213.
81. **Flodby, P., Barlow, C., Kylefjord, H., hrlund-Richter, L., und Xanthopoulos, K.G.** (1996). Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein alpha. *J. Biol. Chem.* **271**, 24753-24760.
82. **Friedrich, G. und Soriano, P.** (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* **5**, 1513-1523.
83. **Fukuda-Taira, S.** (1981). Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **63**, 111-125.
84. **Gautsch, J.W. und Wilson, M.C.** (1983). Delayed de novo methylation in teratocarcinoma suggests additional tissue-specific mechanisms for controlling gene expression. *Nature* **301**, 32-37.
85. **Gherardi, E., Gray, J., Stoker, M., Perryman, M., und Furlong, R.** (1989). Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 5844-5848.

86. **Gherardi,E. und Stoker,M.** (1991). Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met. *Cancer Cells* **3**, 227-232.
87. **Gissel,C., Doss,M.X., Hippler-Altenburg,R., Hescheler,J., und Sachinidis,A.** (2006). Generation and characterization of cardiomyocytes under serum-free conditions. *Methods Mol. Biol.* **330**, 191-219.
88. **Gordon,J.W., Scangos,G.A., Plotkin,D.J., Barbosa,J.A., und Ruddle,F.H.** (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 7380-7384.
89. **Greengard,O.** (1969). Enzymic differentiation in mammalian liver injection of fetal rats with hormones causes the premature formation of liver enzymes. *Science* **163**, 891-895.
90. **Greengard,O., Federman,M., und Knox,W.E.** (1972). Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. *J. Cell Biol.* **52**, 261-272.
91. **Gresh,L., Fischer,E., Reimann,A., Tanguy,M., Garbay,S., Shao,X., Hiesberger,T., Fiette,L., Igarashi,P., Yaniv,M. et al.** (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* **23**, 1657-1668.
92. **Gripon,P., Rumin,S., Urban,S., Le,S.J., Glaise,D., Cannie,I., Guyomard,C., Lucas,J., Trepo,C., und Guguen-Guillouzo,C.** (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 15655-15660.
93. **Gruss,P. und Khoury,G.** (1980). Rescue of a splicing defective mutant by insertion of an heterologous intron. *Nature* **286**, 634-637.
94. **Gruss,P., Lai,C.J., Dhar,R., und Khoury,G.** (1979). Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4317-4321.
95. **Gualdi,R., Bossard,P., Zheng,M., Hamada,Y., Coleman,J.R., und Zaret,K.S.** (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev.* **10**, 1670-1682.
96. **Guild,B.C., Finer,M.H., Housman,D.E., und Mulligan,R.C.** (1988). Development of retrovirus vectors useful for expressing genes in cultured murine embryonal cells and hematopoietic cells in vivo. *J. Virol.* **62**, 3795-3801.
97. **Guy,L.G., Kothary,R., DeRepentigny,Y., Delvoye,N., Ellis,J., und Wall,L.** (1996). The beta-globin locus control region enhances transcription of but does not confer position-independent expression onto the lacZ gene in transgenic mice. *EMBO J.* **15**, 3713-3721.

98. **Haas,D.L., Lutzko,C., Logan,A.C., Cho,G.J., Skelton,D., Jin,Y., X, Pepper,K.A., und Kohn,D.B.** (2003). The Moloney murine leukemia virus repressor binding site represses expression in murine and human hematopoietic stem cells. *J. Virol.* **77**, 9439-9450.
99. **Hamazaki,T., Iiboshi,Y., Oka,M., Papst,P.J., Meacham,A.M., Zon,L.I., und Terada,N.** (2001). Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett.* **497**, 15-19.
100. **Hardon,E.M., Frain,M., Paonessa,G., und Cortese,R.** (1988). Two distinct factors interact with the promoter regions of several liver-specific genes. *EMBO J.* **7**, 1711-1719.
101. **Harmer,N.J.** (2006). Insights into the role of heparan sulphate in fibroblast growth factor signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 442-445.
102. **Hawley,R.G., Sabourin,L.A., und Hawley,T.S.** (1989a). An improved retroviral vector for gene transfer into undifferentiated cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 4001.
103. **Hawley,T.S., Sabourin,L.A., und Hawley,R.G.** (1989b). Comparative analysis of retroviral vector expression in mouse embryonal carcinoma cells. *Plasmid* **22**, 120-131.
104. **Hayhurst,G.P., Lee,Y.H., Lambert,G., Ward,J.M., und Gonzalez,F.J.** (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1393-1403.
105. **Hentsch,B., Lyons,I., Li,R., Hartley,L., Lints,T.J., Adams,J.M., und Harvey,R.P.** (1996). Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev.* **10**, 70-79.
106. **Herbst,R.S., Friedman,N., Darnell,J.E., Jr., und Babiss,L.E.** (1989). Positive and negative regulatory elements in the mouse albumin enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 1553-1557.
107. **Hiesberger,T., Bai,Y., Shao,X., McNally,B.T., Sinclair,A.M., Tian,X., Somlo,S., und Igarashi,P.** (2004). Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice. *J. Clin. Invest* **113**, 814-825.
108. **Hirschi,K.K., Rohovsky,S.A., und D'Amore,P.A.** (1998). PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol.* **141**, 805-814.
109. **Horb,M.E., Shen,C.N., Tosh,D., und Slack,J.M.** (2003). Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr. Biol.* **13**, 105-115.

110. **Houssaint,E.** (1981). Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line. *Cell Differ.* **10**, 243-252.
111. **Hu,A., Cai,J., Zheng,Q., He,X., Pan,Y., und Li,L.** (2003). Hepatic differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Chin Med. J. (Engl.)* **116**, 1893-1897.
112. **Hu,A.B., Cai,J.Y., Zheng,Q.C., He,X.Q., Shan,Y., Pan,Y.L., Zeng,G.C., Hong,A., Dai,Y., und Li,L.S.** (2004). High-ratio differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes in vitro. *Liver Int.* **24**, 237-245.
113. **Hubner,K., Fuhrmann,G., Christenson,L.K., Kehler,J., Reinbold,R., De La,F.R., Wood,J., Strauss,J.F., III, Boiani,M., und Scholer,H.R.** (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* **300**, 1251-1256.
114. **Humphrey,R.K., Beattie,G.M., Lopez,A.D., Bucay,N., King,C.C., Firpo,M.T., Rose-John,S., und Hayek,A.** (2004). Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells* **22**, 522-530.
115. **Hussain,S.Z., Sneddon,T., Tan,X., Micsenyi,A., Michalopoulos,G.K., und Monga,S.P.** (2004). Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp. Cell Res.* **292**, 157-169.
116. **Imamura,T., Cui,L., Teng,R., Johkura,K., Okouchi,Y., Asanuma,K., Ogiwara,N., und Sasaki,K.** (2004). Embryonic stem cell-derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte-like cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng* **10**, 1716-1724.
117. **Ishii,T., Yasuchika,K., Fujii,H., Hoppo,T., Baba,S., Naito,M., Machimoto,T., Kamo,N., Suemori,H., Nakatsuji,N. et al.** (2005). In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **309**, 68-77.
118. **Ishizaka,S., Shiroy,A., Kanda,S., Yoshikawa,M., Tsujinoue,H., Kuriyama,S., Hasuma,T., Nakatani,K., und Takahashi,K.** (2002). Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J.* **16**, 1444-1446.
119. **Jaenisch,R., Harbers,K., Jahner,D., Stewart,C., und Stuhlmann,H.** (1982). DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. *J. Cell Biochem.* **20**, 331-336.
120. **Jahner,D., Stuhlmann,H., Stewart,C.L., Harbers,K., Lohler,J., Simon,I., und Jaenisch,R.** (1982). De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* **298**, 623-628.
121. **Jochheim,A., Hillemann,T., Kania,G., Scharf,J., Attaran,M., Manns,M.P., Wobus,A.M., und Ott,M.** (2004). Quantitative gene expression profiling reveals a fetal hepatic phenotype of murine ES-derived hepatocytes. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 23-29.

122. **Johansson,B.M. und Wiles,M.V.** (1995). Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol. Cell Biol.* **15**, 141-151.
123. **Jones,E.A., Tosh,D., Wilson,D.I., Lindsay,S., und Forrester,L.M.** (2002). Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* **272**, 15-22.
124. **Jung,J., Zheng,M., Goldfarb,M., und Zaret,K.S.** (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**, 1998-2003.
125. **Kaestner,K.H., Hiemisch,H., und Schutz,G.** (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4245-4251.
126. **Kaestner,K.H., Katz,J., Liu,Y., Drucker,D.J., und Schutz,G.** (1999). Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev.* **13**, 495-504.
127. **Kamiya,A., Kinoshita,T., Ito,Y., Matsui,T., Morikawa,Y., Senba,E., Nakashima,K., Taga,T., Yoshida,K., Kishimoto,T. et al.** (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J.* **18**, 2127-2136.
128. **Kamiya,A., Kojima,N., Kinoshita,T., Sakai,Y., und Miyajima,A.** (2002). Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology* **35**, 1351-1359.
129. **Kanda,S., Shiroy,A., Oujy,Y., Birumachi,J., Ueda,S., Fukui,H., Tatsumi,K., Ishizaka,S., Takahashi,Y., und Yoshikawa,M.** (2003). In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Hepatol. Res.* **26**, 225-231.
130. **Kania,G., Blyszczuk,P., Czyz,J., Navarrete-Santos,A., und Wobus,A.M.** (2003). Differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic and hepatic cells. *Methods Enzymol.* **365**, 287-303.
131. **Kania,G., Blyszczuk,P., Jochheim,A., Ott,M., und Wobus,A.M.** (2004). Generation of glycogen- and albumin-producing hepatocyte-like cells from embryonic stem cells. *Biol. Chem.* **385**, 943-953.
132. **Kawakami-Kimura,N., Narita,T., Ohmori,K., Yoneda,T., Matsumoto,K., Nakamura,T., und Kannagi,R.** (1997). Involvement of hepatocyte growth factor in increased integrin expression on HepG2 cells triggered by adhesion to endothelial cells. *Br. J. Cancer* **75**, 47-53.

133. **Kempler, G., Freitag, B., Berwin, B., Nanassy, O., und Barklis, E.** (1993). Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell-specific repressor binding site. *Virology* **193**, 690-699.
134. **Keng, V.W., Fujimori, K.E., Myint, Z., Tamamaki, N., Nojyo, Y., und Noguchi, T.** (1998). Expression of Hex mRNA in early murine postimplantation embryo development. *FEBS Lett.* **426**, 183-186.
135. **Keng, V.W., Yagi, H., Ikawa, M., Nagano, T., Myint, Z., Yamada, K., Tanaka, T., Sato, A., Muramatsu, I., Okabe, M. et al.** (2000). Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1155-1161.
136. **Kim, J.W., Closs, E.I., Albritton, L.M., und Cunningham, J.M.** (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* **352**, 725-728.
137. **Kisseberth, W.C., Brettingen, N.T., Lohse, J.K., und Sandgren, E.P.** (1999). Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev. Biol.* **214**, 128-138.
138. **Klug, C.A., Cheshier, S., und Weissman, I.L.** (2000). Inactivation of a GFP retrovirus occurs at multiple levels in long-term repopulating stem cells and their differentiated progeny. *Blood* **96**, 894-901.
139. **Kohler, C., Bell, A.W., Bowen, W.C., Monga, S.P., Fleig, W., und Michalopoulos, G.K.** (2004). Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* **39**, 1056-1065.
140. **Kuai, X.L., Cong, X.Q., Li, X.L., und Xiao, S.D.** (2003). Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl.* **9**, 1094-1099.
141. **Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J.M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., Fehling, H.J., und Keller, G.** (2004). Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* **131**, 1651-1662.
142. **Kulkarni, J.S. und Khanna, A.** (2006). Functional hepatocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells: A novel in vitro hepatotoxicity model for drug screening. *Toxicol. In Vitro* **20**, 1014-1022.
143. **Kumar, D., Kamp, T.J., und LeWinter, M.M.** (2005). Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration. *Coron. Artery Dis.* **16**, 111-116.
144. **Kumashiro, Y., Teramoto, K., Shimizu-Saito, K., Asahina, K., Teraoka, H., und Arii, S.** (2005). Isolation of hepatocyte-like cells from mouse embryoid body cells. *Transplant. Proc.* **37**, 299-300.

145. **Kuo,C.J., Conley,P.B., Chen,L., Sladek,F.M., Darnell,J.E., Jr., und Crabtree,G.R.** (1992). A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* **355**, 457-461.
146. **Kuo,C.T., Morrissey,E.E., Anandappa,R., Sigrist,K., Lu,M.M., Parmacek,M.S., Soudais,C., und Leiden,J.M.** (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* **11**, 1048-1060.
147. **Laker,C., Meyer,J., Schopen,A., Friel,J., Heberlein,C., Ostertag,W., und Stocking,C.** (1998). Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J. Virol.* **72**, 339-348.
148. **Lammert,E., Brown,J., und Melton,D.A.** (2000). Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech. Dev.* **94**, 199-203.
149. **Lavon,N. und Benvenisty,N.** (2005). Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J. Cell Biochem.* **96**, 1193-1202.
150. **Lavon,N., Yanuka,O., und Benvenisty,N.** (2004). Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* **72**, 230-238.
151. **Leahy,A., Xiong,J.W., Kuhnert,F., und Stuhlmann,H.** (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J. Exp. Zool.* **284**, 67-81.
152. **Lee,J.W. und Juliano,R.** (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol. Cells* **17**, 188-202.
153. **Levenberg,S., Huang,N.F., Lavik,E., Rogers,A.B., Itskovitz-Eldor,J., und Langer,R.** (2003). Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 12741-12746.
154. **Li,J., Ning,G., und Duncan,S.A.** (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev.* **14**, 464-474.
155. **Li,L., Krantz,I.D., Deng,Y., Genin,A., Banta,A.B., Collins,C.C., Qi,M., Trask,B.J., Kuo,W.L., Cochran,J. et al.** (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat. Genet.* **16**, 243-251.
156. **Lichtsteiner,S. und Schibler,U.** (1989). A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene. *Cell* **57**, 1179-1187.
157. **Loomes,K.M., Taichman,D.B., Glover,C.L., Williams,P.T., Markowitz,J.E., Piccoli,D.A., Baldwin,H.S., und Oakey,R.J.** (2002). Characterization of Notch receptor expression in the developing mammalian heart and liver. *Am. J. Med. Genet.* **112**, 181-189.

158. **Lora, J.M., Rowader, K.E., Soares, L., Giancotti, F., und Zaret, K.S.** (1998). Alpha3beta1-integrin as a critical mediator of the hepatic differentiation response to the extracellular matrix. *Hepatology* **28**, 1095-1104.
159. **Luzzatto, A.C.** (1981). Hepatocyte differentiation during early fetal development in the rat. *Cell Tissue Res.* **215**, 133-142.
160. **Mao, X., Fujiwara, Y., und Orkin, S.H.** (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 5037-5042.
161. **Martin, G.R.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**, 7634-7638.
162. **Martinez Barbera, J.P., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D., und Beddington, R.S.** (2000). The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127**, 2433-2445.
163. **Masui, S., Shimosato, D., Toyooka, Y., Yagi, R., Takahashi, K., und Niwa, H.** (2005). An efficient system to establish multiple embryonic stem cell lines carrying an inducible expression unit. *Nucleic Acids Res.* **33**, e43.
164. **Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., und Yokota, T.** (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* **18**, 4261-4269.
165. **Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., und Zaret, K.S.** (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* **294**, 559-563.
166. **McCright, B., Lozier, J., und Gridley, T.** (2002). A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency. *Development* **129**, 1075-1082.
167. **Medlock, E.S. und Haar, J.L.** (1983). The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. *Anat. Rec.* **207**, 31-41.
168. **Meyn, M.A., III, Schreiner, S.J., Dumitrescu, T.P., Nau, G.J., und Smithgall, T.E.** (2005). SRC family kinase activity is required for murine embryonic stem cell growth and differentiation. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1320-1330.
169. **Micallef, S.J., Janes, M.E., Knezevic, K., Davis, R.P., Elefanty, A.G., und Stanley, E.G.** (2005). Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells. *Diabetes* **54**, 301-305.

170. **Michalopoulos,G.K., Bowen,W.C., Mule,K., and Luo,J.** (2003). HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr.* **11**, 55-75.
171. **Michalopoulos,G.K., Bowen,W.C., Mule,K., and Stolz,D.B.** (2001). Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am. J. Pathol.* **159**, 1877-1887.
172. **Michalopoulos,G.K., Bowen,W.C., Zajac,V.F., Beer-Stolz,D., Watkins,S., Kostrubsky,V., and Strom,S.C.** (1999). Morphogenetic events in mixed cultures of rat hepatocytes and nonparenchymal cells maintained in biological matrices in the presence of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Hepatology* **29**, 90-100.
173. **Micsenyi,A., Tan,X., Sneddon,T., Luo,J.H., Michalopoulos,G.K., and Monga,S.P.** (2004). Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* **126**, 1134-1146.
174. **Mishra,L., Cai,T., Yu,P., Monga,S.P., and Mishra,B.** (1999). Elf3 encodes a novel 200-kD beta-spectrin: role in liver development. *Oncogene* **18**, 353-364.
175. **Mitsui,K., Tokuzawa,Y., Itoh,H., Segawa,K., Murakami,M., Takahashi,K., Maruyama,M., Maeda,M., and Yamanaka,S.** (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-642.
176. **Miura,K., Nagai,H., Ueno,Y., Goto,T., Mikami,K., Nakane,K., Yoneyama,K., Watanabe,D., Terada,K., Sugiyama,T. et al.** (2003). Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 415-423.
177. **Miyashita,H., Suzuki,A., Fukao,K., Nakauchi,H., and Taniguchi,H.** (2002). Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Cell Transplant.* **11**, 429-434.
178. **Miyazaki,S., Miyazaki,T., Tashiro,F., Yamato,E., and Miyazaki,J.** (2005). Development of a single-cassette system for spatiotemporal gene regulation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1083-1088.
179. **Miyazaki,S., Yamato,E., and Miyazaki,J.** (2004). Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* **53**, 1030-1037.
180. **Modin,C., Pedersen,F.S., and Duch,M.** (2000). Lack of shielding of primer binding site silencer-mediated repression of an internal promoter in a retrovirus vector by the putative insulators scs, BEAD-1, and HS4. *J. Virol.* **74**, 11697-11707.

181. **Molkentin,J.D., Lin,Q., Duncan,S.A., and Olson,E.N.** (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* **11**, 1061-1072.
182. **Monga,S.P., Monga,H.K., Tan,X., Mule,K., Pediaditakis,P., and Michalopoulos,G.K.** (2003). Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* **124**, 202-216.
183. **Morrissey,E.E., Tang,Z., Sigrist,K., Lu,M.M., Jiang,F., Ip,H.S., and Parmacek,M.S.** (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* **12**, 3579-3590.
184. **Mullis,K.B. and Faloona,F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
185. **Nagy,A., Gocza,E., Diaz,E.M., Prideaux,V.R., Ivanyi,E., Markkula,M., and Rossant,J.** (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* **110**, 815-821.
186. **Nakabayashi,H., Taketa,K., Miyano,K., Yamane,T., and Sato,J.** (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858-3863.
187. **Nakano,T., Kodama,H., and Honjo,T.** (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265**, 1098-1101.
188. **Naldini,L., Vigna,E., Narsimhan,R.P., Gaudino,G., Zarnegar,R., Michalopoulos,G.K., and Comoglio,P.M.** (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* **6**, 501-504.
189. **Nemeth,A.M.** (1954). Glucose-6-phosphatase in the liver of the fetal guinea pig. *J. Biol. Chem.* **208**, 773-776.
190. **Nichols,J., Chambers,I., Taga,T., and Smith,A.** (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* **128**, 2333-2339.
191. **Nichols,J., Zevnik,B., Anastassiadis,K., Niwa,H., Klewe-Nebenius,D., Chambers,I., Scholer,H., and Smith,A.** (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391.

192. **Nijjar,S.S., Wallace,L., Crosby,H.A., Hubscher,S.G., und Strain,A.J.** (2002). Altered Notch ligand expression in human liver disease: further evidence for a role of the Notch signaling pathway in hepatic neovascularization and biliary ductular defects. *Am. J. Pathol.* **160**, 1695-1703.
193. **Nishikawa,S.I., Nishikawa,S., Hirashima,M., Matsuyoshi,N., und Kodama,H.** (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* **125**, 1747-1757.
194. **Niwa,H., Burdon,T., Chambers,I., und Smith,A.** (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* **12**, 2048-2060.
195. **Niwa,H., Miyazaki,J., und Smith,A.G.** (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* **24**, 372-376.
196. **Niwa,H., Yamamura,K., und Miyazaki,J.** (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.
197. **Niwa,M. und Berget,S.M.** (1991). Polyadenylation precedes splicing in vitro. *Gene Expr.* **1**, 5-14.
198. **Niwa,O., Yokota,Y., Ishida,H., und Sugahara,T.** (1983). Independent mechanisms involved in suppression of the Moloney leukemia virus genome during differentiation of murine teratocarcinoma cells. *Cell* **32**, 1105-1113.
199. **Oda,T., Elkahoun,A.G., Pike,B.L., Okajima,K., Krantz,I.D., Genin,A., Piccoli,D.A., Meltzer,P.S., Spinner,N.B., Collins,F.S. et al.** (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat. Genet.* **16**, 235-242.
200. **Odom,D.T., Zizlsperger,N., Gordon,D.B., Bell,G.W., Rinaldi,N.J., Murray,H.L., Volkert,T.L., Schreiber,J., Rolfe,P.A., Gifford,D.K. et al.** (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**, 1378-1381.
201. **Ogawa,S., Tagawa,Y., Kamiyoshi,A., Suzuki,A., Nakayama,J., Hashikura,Y., und Miyagawa,S.** (2005). Crucial roles of mesodermal cell lineages in a murine embryonic stem cell-derived in vitro liver organogenesis system. *Stem Cells* **23**, 903-913.
202. **Oie,H.K., Russell,E.K., Dotson,J.H., Rhoads,J.M., und Gazdar,A.F.** (1976). Host-range properties of murine xenotropic and ecotropic type-C viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* **56**, 423-426.

203. **Olsen,A.L., Stachura,D.L., and Weiss,M.J.** (2006). Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. *Blood* **107**, 1265-1275.
204. **Orban,P.C., Chui,D., and Marth,J.D.** (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 6861-6865.
205. **Ornitz,D.M., Xu,J., Colvin,J.S., McEwen,D.G., MacArthur,C.A., Coulier,F., Gao,G., and Goldfarb,M.** (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**, 15292-15297.
206. **Paling,N.R., Whheadon,H., Bone,H.K., and Welham,M.J.** (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 48063-48070.
207. **Palmiter,R.D., Brinster,R.L., Hammer,R.E., Trumbauer,M.E., Rosenfeld,M.G., Birnberg,N.C., and Evans,R.M.** (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300**, 611-615.
208. **Pan,C.J., Lei,K.J., Chen,H., Ward,J.M., and Chou,J.Y.** (1998). Ontogeny of the murine glucose-6-phosphatase system. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 17-24.
209. **Pan,G., Li,J., Zhou,Y., Zheng,H., and Pei,D.** (2006). A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.*
210. **Panduro,A., Shalaby,F., and Shafritz,D.A.** (1987). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of liver-specific gene expression during rat development. *Genes Dev.* **1**, 1172-1182.
211. **Pannell,D., Osborne,C.S., Yao,S., Sukonnik,T., Pasceri,P., Karaiskakis,A., Okano,M., Li,E., Lipshitz,H.D., and Ellis,J.** (2000). Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code. *EMBO J.* **19**, 5884-5894.
212. **Partanen,J., Makela,T.P., Eerola,E., Korhonen,J., Hirvonen,H., Claesson-Welsh,L., and Alitalo,K.** (1991). FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.* **10**, 1347-1354.
213. **Parviz,F., Matullo,C., Garrison,W.D., Savatski,L., Adamson,J.W., Ning,G., Kaestner,K.H., Rossi,J.M., Zaret,K.S., and Duncan,S.A.** (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* **34**, 292-296.

214. **Passier,R., Oostwaard,D.W., Snapper,J., Kloots,J., Hassink,R.J., Kuijk,E., Roelen,B., de la Riviere,A.B., und Mummery,C.** (2005). Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* **23**, 772-780.
215. **Pease,S., Braghetta,P., Gearing,D., Grail,D., und Williams,R.L.** (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev. Biol.* **141**, 344-352.
216. **Pease,S. und Williams,R.L.** (1990). Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp. Cell Res.* **190**, 209-211.
217. **Pesce,M., Gross,M.K., und Scholer,H.R.** (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* **20**, 722-732.
218. **Petersen,R., Kempler,G., und Barklis,E.** (1991). A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus. *Mol. Cell Biol.* **11**, 1214-1221.
219. **Pinkert,C.A., Ornitz,D.M., Brinster,R.L., und Palmiter,R.D.** (1987). An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev.* **1**, 268-276.
220. **Pontoglio,M., Barra,J., Hadchouel,M., Doyen,A., Kress,C., Bach,J.P., Babinet,C., und Yaniv,M.** (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* **84**, 575-585.
221. **Pontoglio,M., Faust,D.M., Doyen,A., Yaniv,M., und Weiss,M.C.** (1997). Hepatocyte nuclear factor 1alpha gene inactivation impairs chromatin remodeling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4948-4956.
222. **Pozzi,A. und Zent,R.** (2003). Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp. Nephrol.* **94**, e77-e84.
223. **Qi,X., Li,T.G., Hao,J., Hu,J., Wang,J., Simmons,H., Miura,S., Mishina,Y., und Zhao,G.Q.** (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6027-6032.
224. **Quinn,G., Ochiya,T., Terada,M., und Yoshida,T.** (2000). Mouse flt-1 promoter directs endothelial-specific expression in the embryoid body model of embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1089-1099.
225. **Rambhatla,L., Chiu,C.P., Kundu,P., Peng,Y., und Carpenter,M.K.** (2003). Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant.* **12**, 1-11.

226. **Rausa,F.M., Tan,Y., Zhou,H., Yoo,K.W., Stolz,D.B., Watkins,S.C., Franks,R.R., Unterman,T.G., und Costa,R.H.** (2000). Elevated levels of hepatocyte nuclear factor 3beta in mouse hepatocytes influence expression of genes involved in bile acid and glucose homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8264-8282.
227. **Reh,T.A., Nagy,T., und Gretton,H.** (1987). Retinal pigmented epithelial cells induced to transdifferentiate to neurons by laminin. *Nature* **330**, 68-71.
228. **Reissmann,E., Ernsberger,U., Francis-West,P.H., Rueger,D., Brickell,P.M., und Rohrer,H.** (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* **122**, 2079-2088.
229. **Robertson,E., Bradley,A., Kuehn,M., und Evans,M.** (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* **323**, 445-448.
230. **Rogler,L.E.** (1997). Selective bipotential differentiation of mouse embryonic hepatoblasts in vitro. *Am. J. Pathol.* **150**, 591-602.
231. **Rohwedel,J., Guan,K., und Wobus,A.M.** (1999). Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues. Organs* **165**, 190-202.
232. **Rossi,J.M., Dunn,N.R., Hogan,B.L., und Zaret,K.S.** (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* **15**, 1998-2009.
233. **Rubenstein,J.L., Nicolas,J.F., und Jacob,F.** (1984). Construction of a retrovirus capable of transducing and expressing genes in multipotential embryonic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 7137-7140.
234. **Sage,H., Pritzl,P., und Bornstein,P.** (1981). Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary, and corneal endothelium. *Arteriosclerosis* **1**, 427-442.
235. **Saijoh,Y., Fujii,H., Meno,C., Sato,M., Hirota,Y., Nagamatsu,S., Ikeda,M., und Hamada,H.** (1996). Identification of putative downstream genes of Oct-3, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells* **1**, 239-252.
236. **Sambrook,J. und Russell,D.W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
237. **Sanchez,A., Alvarez,A.M., Benito,M., und Fabregat,I.** (1995). Transforming growth factor beta modulates growth and differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *J. Cell Physiol* **165**, 398-405.

238. **Sanchez,A., Alvarez,A.M., Pagan,R., Roncero,C., Vilaro,S., Benito,M., und Fabregat,I.** (2000). Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J. Hepatol.* **32**, 242-250.
239. **Sanger,F., Nicklen,S., und Coulson,A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467.
240. **Sato,N., Meijer,L., Skaltsounis,L., Greengard,P., und Brivanlou,A.H.** (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* **10**, 55-63.
241. **Schmidt,C., Blatt,F., Goedecke,S., Brinkmann,V., Zschesche,W., Sharpe,M., Gherardi,E., und Birchmeier,C.** (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699-702.
242. **Schmoll,D., Allan,B.B., und Burchell,A.** (1996). Cloning and sequencing of the 5' region of the human glucose-6-phosphatase gene: transcriptional regulation by cAMP, insulin and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *FEBS Lett.* **383**, 63-66.
243. **Schmoll,D., Wasner,C., Hinds,C.J., Allan,B.B., Walther,R., und Burchell,A.** (1999). Identification of a cAMP response element within the glucose- 6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *Biochem. J.* **338 (Pt 2)**, 457-463.
244. **Scholer,H.R., Hatzopoulos,A.K., Balling,R., Suzuki,N., und Gruss,P.** (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* **8**, 2543-2550.
245. **Schwartz,R.E., Linehan,J.L., Painschab,M.S., Hu,W.S., Verfaillie,C.M., und Kaufman,D.S.** (2005). Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **14**, 643-655.
246. **Sekhon,S.S., Tan,X., Micsenyi,A., Bowen,W.C., und Monga,S.P.** (2004). Fibroblast growth factor enriches the embryonic liver cultures for hepatic progenitors. *Am. J. Pathol.* **164**, 2229-2240.
247. **Sekine,S., Lan,B.Y., Bedolli,M., Feng,S., und Hebrok,M.** (2006). Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology* **43**, 817-825.
248. **Serls,A.E., Doherty,S., Parvatiyar,P., Wells,J.M., und Deutsch,G.H.** (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* **132**, 35-47.

249. **Shah,N.M., Groves,A.K., und Anderson,D.J.** (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* **85**, 331-343.
250. **Sharma,N.S., Shikhanovich,R., Schloss,R., und Yarmush,M.L.** (2006). Sodium butyrate treated embryonic stem cells yield hepatocyte-like cells expressing a glycolytic phenotype. *Biotechnol. Bioeng.*
251. **Shelly,L.L., Tynan,W., Schmid,W., Schutz,G., und Yeoh,G.C.** (1989). Hepatocyte differentiation in vitro: initiation of tyrosine aminotransferase expression in cultured fetal rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* **109**, 3403-3410.
252. **Shen,C.N., Seckl,J.R., Slack,J.M., und Tosh,D.** (2003). Glucocorticoids suppress beta-cell development and induce hepatic metaplasia in embryonic pancreas. *Biochem. J.* **375**, 41-50.
253. **Sherer,G.K.** (1975). Tissue interaction in chick liver development: a reevaluation. I. Epithelial morphogenesis: the role of vascularity in mesenchymal specificity. *Dev. Biol.* **46**, 281-295.
254. **Shih,D.Q., Navas,M.A., Kuwajima,S., Duncan,S.A., und Stoffel,M.** (1999). Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10152-10157.
255. **Shim,E.Y., Woodcock,C., und Zaret,K.S.** (1998). Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev.* **12**, 5-10.
256. **Shin,J.W., Min,M., Larrieu-Lahargue,F., Canron,X., Kunstfeld,R., Nguyen,L., Henderson,J.E., Bikfalvi,A., Detmar,M., und Hong,Y.K.** (2006). Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for FGF signaling in lymphangiogenesis. *Mol. Biol. Cell* **17**, 576-584.
257. **Shiojiri,N. und Sugiyama,Y.** (2004). Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development. *Hepatology* **40**, 346-355.
258. **Shiojiri,N., Takeshita,K., Yamasaki,H., und Iwata,T.** (2004). Suppression of C/EBP alpha expression in biliary cell differentiation from hepatoblasts during mouse liver development. *J. Hepatol.* **41**, 790-798.
259. **Shiota,G., Wang,T.C., Nakamura,T., und Schmidt,E.V.** (1994). Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* **19**, 962-972.
260. **Shirahashi,H., Wu,J., Yamamoto,N., Catana,A., Wege,H., Wager,B., Okita,K., und Zern,M.A.** (2004). Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant.* **13**, 197-211.

261. **Smith,A.G., Heath,J.K., Donaldson,D.D., Wong,G.G., Moreau,J., Stahl,M., und Rogers,D.** (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690.
262. **Smith,A.G. und Hooper,M.L.** (1987). Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **121**, 1-9.
263. **Solter,D. und Knowles,B.B.** (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 5565-5569.
264. **Sonnenberg,E., Meyer,D., Weidner,K.M., und Birchmeier,C.** (1993a). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.* **123**, 223-235.
265. **Sonnenberg,E., Weidner,K.M., und Birchmeier,C.** (1993b). Expression of the met-receptor and its ligand, HGF-SF during mouse embryogenesis. *EXS* **65**, 381-394.
266. **Soria,B., Roche,E., Reig,J.A., und Martin,F.** (2005). Generation of insulin-producing cells from stem cells. *Novartis. Found. Symp.* **265**, 158-167.
267. **Soriano,P.** (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* **21**, 70-71.
268. **Soriano,P., Cone,R.D., Mulligan,R.C., und Jaenisch,R.** (1986). Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses. *Science* **234**, 1409-1413.
269. **Sosa-Pineda,B., Wigle,J.T., und Oliver,G.** (2000). Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat. Genet.* **25**, 254-255.
270. **Spagnoli,F.M., Amicone,L., Tripodi,M., und Weiss,M.C.** (1998). Identification of a bipotential precursor cell in hepatic cell lines derived from transgenic mice expressing cyto-Met in the liver. *J. Cell Biol.* **143**, 1101-1112.
271. **Spagnoli,F.M., Cicchini,C., Tripodi,M., und Weiss,M.C.** (2000). Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF(beta) is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 20)**, 3639-3647.
272. **Spath,G.F. und Weiss,M.C.** (1997). Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1913-1922.

273. **Srinivas,S., Watanabe,T., Lin,C.S., William,C.M., Tanabe,Y., Jessell,T.M., und Costantini,F.** (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC. Dev. Biol.* **1**, 4.
274. **Sternberg,N. und Hamilton,D.** (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* **150**, 467-486.
275. **Stewart,C.L., Schuetze,S., Vanek,M., und Wagner,E.F.** (1987). Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection. *EMBOJ.* **6**, 383-388.
276. **Stewart,C.L., Stuhlmann,H., Jahner,D., und Jaenisch,R.** (1982). De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 4098-4102.
277. **Streeper,R.S., Hornbuckle,L.A., Svitek,C.A., Goldman,J.K., Oeser,J.K., und O'Brien,R.M.** (2001). Protein kinase A phosphorylates hepatocyte nuclear factor-6 and stimulates glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription. *J. Biol. Chem.* **276**, 19111-19118.
278. **Streeper,R.S., Svitek,C.A., Chapman,S., Greenbaum,L.E., Taub,R., und O'Brien,R.M.** (1997). A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 11698-11701.
279. **Strick-Marchand,H. und Weiss,M.C.** (2002). Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology* **36**, 794-804.
280. **Stupack,D.G. und Cheresch,D.A.** (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* **115**, 3729-3738.
281. **Suksaweang,S., Lin,C.M., Jiang,T.X., Hughes,M.W., Widelitz,R.B., und Chuong,C.M.** (2004). Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. *Dev. Biol.* **266**, 109-122.
282. **Suzuki,A., Iwama,A., Miyashita,H., Nakauchi,H., und Taniguchi,H.** (2003). Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* **130**, 2513-2524.
283. **Swindle,C.S., Kim,H.G., und Klug,C.A.** (2004). Mutation of CpGs in the murine stem cell virus retroviral vector long terminal repeat represses silencing in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 34-41.

284. **Taha,M.F., Valojerdi,M.R., und Mowla,S.J.** (2006). Effect of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on adipocyte differentiation from mouse embryonic stem cells. *Anat. Histol. Embryol.* **35**, 271-278.
285. **Tan,X., Apte,U., Micsenyi,A., Kotsagrellos,E., Luo,J.H., Ranganathan,S., Monga,D.K., Bell,A., Michalopoulos,G.K., und Monga,S.P.** (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology* **129**, 285-302.
286. **Tanaka,H., Yamamoto,T., Ban,T., Satoh,S., Tanaka,T., Shimoda,M., Miyazaki,J., und Noguchi,T.** (2005). Hex stimulates the hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* **442**, 117-124.
287. **Tang,Y., Katuri,V., Dillner,A., Mishra,B., Deng,C.X., und Mishra,L.** (2003). Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* **299**, 574-577.
288. **Tanimizu,N. und Miyajima,A.** (2004). Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J. Cell Sci.* **117**, 3165-3174.
289. **Teich,N.M., Weiss,R.A., Martin,G.R., und Lowy,D.R.** (1977). Virus infection of murine teratocarcinoma stem cell lines. *Cell* **12**, 973-982.
290. **Teramoto,K., Asahina,K., Kumashiro,Y., Kakinuma,S., Chinzei,R., Shimizu-Saito,K., Tanaka,Y., Teraoka,H., und Arii,S.** (2005). Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **12**, 196-202.
291. **Teratani,T., Yamamoto,H., Aoyagi,K., Sasaki,H., Asari,A., Quinn,G., Sasaki,H., Terada,M., und Ochiya,T.** (2005). Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* **41**, 836-846.
292. **Thomas,K.R. und Capecchi,M.R.** (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512.
293. **Thomas,P.Q., Brown,A., und Beddington,R.S.** (1998). Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* **125**, 85-94.
294. **Thomson,J.A., Itskovitz-Eldor,J., Shapiro,S.S., Waknitz,M.A., Swiergiel,J.J., Marshall,V.S., und Jones,J.M.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.

295. **Timchenko,N.A., Harris,T.E., Wilde,M., Bilyeu,T.A., Burgess-Beusse,B.L., Finegold,M.J., und Darlington,G.J.** (1997). CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol. Cell Biol.* **17**, 7353-7361.
296. **Tokuzawa,Y., Kaiho,E., Maruyama,M., Takahashi,K., Mitsui,K., Maeda,M., Niwa,H., und Yamanaka,S.** (2003). Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol. Cell Biol.* **23**, 2699-2708.
297. **Tosh,D., Shen,C.N., und Slack,J.M.** (2002b). Differentiated properties of hepatocytes induced from pancreatic cells. *Hepatology* **36**, 534-543.
298. **Tosh,D., Shen,C.N., und Slack,J.M.** (2002a). Conversion of pancreatic cells to hepatocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 51-55.
299. **Townes,T.M., Lingrel,J.B., Chen,H.Y., Brinster,R.L., und Palmiter,R.D.** (1985). Erythroid-specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice. *EMBO J.* **4**, 1715-1723.
300. **Tremblay,K.D. und Zaret,K.S.** (2005). Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev. Biol.* **280**, 87-99.
301. **Tronche,F., Rollier,A., Bach,I., Weiss,M.C., und Yaniv,M.** (1989). The rat albumin promoter: cooperation with upstream elements is required when binding of APF/HNF1 to the proximal element is partially impaired by mutation or bacterial methylation. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4759-4766.
302. **Tropepe,V., Hitoshi,S., Sirard,C., Mak,T.W., Rossant,J., und van der,K.D.** (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* **30**, 65-78.
303. **Tsutsui,M., Ogawa,S., Inada,Y., Tomioka,E., Kamiyoshi,A., Tanaka,S., Kishida,T., Nishiyama,M., Murakami,M., Kuroda,J. et al.** (2006). Characterization of cytochrome P450 expression in murine embryonic stem cell-derived hepatic tissue system. *Drug Metab Dispos.*
304. **Tsutsumi,K., Ito,K., und Ishikawa,K.** (1989). Developmental appearance of transcription factors that regulate liver-specific expression of the aldolase B gene. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4923-4931.
305. **Ueno,M., Matsumura,M., Watanabe,K., Nakamura,T., Osakada,F., Takahashi,M., Kawasaki,H., Kinoshita,S., und Sasai,Y.** (2006). Neural conversion of ES cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 9554-9559.

306. **Vander Kooi, B. T., Streeper, R. S., Svitek, C. A., Oeser, J. K., Powell, D. R., and O'Brien, R. M.** (2003). The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *J. Biol. Chem.* **278**, 11782-11793.
307. **Vassy, J., Kraemer, M., Chalumeau, M. T., and Foucrier, J.** (1988). Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Differ.* **24**, 9-24.
308. **Vaulont, S., Puzeat, N., Levrat, F., Cognet, M., Kahn, A., and Raymondjean, M.** (1989). Proteins binding to the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. A unique combination of known factors. *J. Mol. Biol.* **209**, 205-219.
309. **Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A. et al.** (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
310. **Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A., and Kabat, D.** (1991a). Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* **352**, 729-731.
311. **Wang, H., Paul, R., Burgeson, R. E., Keene, D. R., and Kabat, D.** (1991b). Plasma membrane receptors for ecotropic murine retroviruses require a limiting accessory factor. *J. Virol.* **65**, 6468-6477.
312. **Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R., and Darlington, G. J.** (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**, 1108-1112.
313. **Wang, R. Y., Shen, C. N., Lin, M. H., Tosh, D., and Shih, C.** (2005). Hepatocyte-like cells transdifferentiated from a pancreatic origin can support replication of hepatitis B virus. *J. Virol.* **79**, 13116-13128.
314. **Ward, C. M., Barrow, K. M., and Stern, P. L.** (2004). Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions. *Exp. Cell Res.* **293**, 229-238.
315. **Ward, C. M. and Stern, P. L.** (2002). The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **20**, 472-475.
316. **Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T., and Nakano, T.** (2006). Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25**, 2697-2707.

317. **Waterston,R.H., Lindblad-Toh,K., Birney,E., Rogers,J., Abril,J.F., Agarwal,P., Agarwala,R., Ainscough,R., Alexandersson,M., An,P. et al.** (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562.
318. **Weidner,K.M., Behrens,J., Vandekerckhove,J., und Birchmeier,W.** (1990). Scatter factor: molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **111**, 2097-2108.
319. **Weinstein,D.C., Altaba,A., Chen,W.S., Hoodless,P., Prezioso,V.R., Jessell,T.M., und Darnell,J.E., Jr.** (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* **78**, 575-588.
320. **Weinstein,M., Monga,S.P., Liu,Y., Brodie,S.G., Tang,Y., Li,C., Mishra,L., und Deng,C.X.** (2001). Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol. Cell Biol.* **21**, 5122-5131.
321. **Wetterberg,I., Bauren,G., und Wieslander,L.** (1996). The intranuclear site of excision of each intron in Balbiani ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *RNA.* **2**, 641-651.
322. **Wiles,M.V. und Johansson,B.M.** (1999). Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp. Cell Res.* **247**, 241-248.
323. **Wiles,M.V. und Keller,G.** (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* **111**, 259-267.
324. **Williams,R.L., Hilton,D.J., Pease,S., Willson,T.A., Stewart,C.L., Gearing,D.P., Wagner,E.F., Metcalf,D., Nicola,N.A., und Gough,N.M.** (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687.
325. **Wobus,A.M., Holzhausen,H., Jakel,P., und Schoneich,J.** (1984). Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp. Cell Res.* **152**, 212-219.
326. **Wobus,A.M., Wallukat,G., und Hescheler,J.** (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* **48**, 173-182.
327. **Wood,S.A., Allen,N.D., Rossant,J., Auerbach,A., und Nagy,A.** (1993). Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature* **365**, 87-89.

328. **Wright,M., Aikawa,M., Szeto,W., und Papkoff,J.** (1999). Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 384-388.
329. **Wu,H. und Sun,Y.E.** (2006). Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr. Res.* **59**, 21R-25R.
330. **Wu,X., Li,Y., Crise,B., und Burgess,S.M.** (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**, 1749-1751.
331. **Yamada,T., Yoshikawa,M., Kanda,S., Kato,Y., Nakajima,Y., Ishizaka,S., und Tsunoda,Y.** (2002). In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* **20**, 146-154.
332. **Yamamoto,Y., Teratani,T., Yamamoto,H., Quinn,G., Murata,S., Ikeda,R., Kinoshita,K., Matsubara,K., Kato,T., und Ochiya,T.** (2005). Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from murine embryonic stem cells. *Hepatology* **42**, 558-567.
333. **Yan,C., Costa,R.H., Darnell,J.E., Jr., Chen,J.D., und Van Dyke,T.A.** (1990). Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice. *EMBO J.* **9**, 869-878.
334. **Yao,S., Sukonnik,T., Kean,T., Bharadwaj,R.R., Pasceri,P., und Ellis,J.** (2004). Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol. Ther.* **10**, 27-36.
335. **Yeom,Y.I., Fuhrmann,G., Ovitt,C.E., Brehm,A., Ohbo,K., Gross,M., Hubner,K., und Scholer,H.R.** (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**, 881-894.
336. **Ying,Q.L., Nichols,J., Chambers,I., und Smith,A.** (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292.
337. **Yuan,H., Corbi,N., Basilico,C., und Dailey,L.** (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* **9**, 2635-2645.
338. **Zambrowicz,B.P., Imamoto,A., Fiering,S., Herzenberg,L.A., Kerr,W.G., und Soriano,P.** (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 3789-3794.

339. **Zeng,X., Chen,J., Sanchez,J.F., Coggiano,M., Ilon-Carter,O., Petersen,J., und Freed,W.J.** (2003). Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells* **21**, 647-653.
340. **Zhang,J.G., Owczarek,C.M., Ward,L.D., Howlett,G.J., Fabri,L.J., Roberts,B.A., und Nicola,N.A.** (1997). Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem. J.* **325** (Pt 3), 693-700.
341. **Zhang,W., Yatskievych,T.A., Baker,R.K., und Antin,P.B.** (2004). Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling. *Dev. Biol.* **268**, 312-326.
342. **Zhang,W., Yatskievych,T.A., Cao,X., und Antin,P.B.** (2002). Regulation of Hex gene expression by a Smads-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 45435-45441.
343. **Zhao,R. und Duncan,S.A.** (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* **41**, 956-967.
344. **Zhao,R., Watt,A.J., Li,J., Luebke-Wheeler,J., Morrissey,E.E., und Duncan,S.A.** (2005). GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation. *Mol. Cell Biol.* **25**, 2622-2631.
345. **Zheng,G.D., Hidaka,K., und Morisaki,T.** (2005). Stable and uniform gene suppression by site-specific integration of siRNA expression cassette in murine embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**, 1028-1034.
346. **Zorn,A.M., Butler,K., und Gurdon,J.B.** (1999). Anterior endomesoderm specification in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and TGF-beta signalling pathways. *Dev. Biol.* **209**, 282-297.

VI.2 Danksagung

Ich danke allen, die zu zur erfolgreichen Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

- Herrn Dr. Eberhard Hildt für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe erstellen zu können. Er nahm sich immer die Zeit für Diskussionen und investierte viel Zeit und Geduld in diese Arbeit.
- Frau Prof. Dr. Susanne Modrow für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Erstgutachterin. Sie hat sich weit über diese Rolle hinaus für mich eingesetzt, wofür ich ihr sehr dankbar bin.
- Prof. Dr. Georg Pauli für seine Bereitschaft, als Zweitgutachter diese Arbeit zu beurteilen und für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe fertigstellen zu können. Vielen Dank für alles.
- Dr. Heinz Himmelbauer, Dr. Sirma Hüseyin, Dr. Peter Löser, Richard D. Palmiter, Dr. Lars Stöckl und David Tosh und vielen anderen für die freundliche Bereitstellung von Plasmiden und Zelllinien.
- Joachim Lupberger und allen anderen Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten der NG1, die diese Zeit zu einer unvergesslichen Erinnerung gemacht haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei Ute Distler, Anna Feist, Ingrid Heger und Elena Rastew, die im Zuge eines Praktikums an dieser Arbeit mitgewirkt haben.
- Allen Mitgliedern der ZBS1 für ihre freundliche Aufnahme in der Gruppe. Ich hätte nicht gedacht, hier in den letzten Monaten meiner Arbeit noch so viel Unterstützung und Hilfe zu erhalten.
- Allen Mitarbeitern des RKI, die mir weitergeholfen haben, wenn ich ein Problem hatte. Hierbei besonders erwähnen möchte ich Kasimierz Madela und Hi-Gung Bae für ihre Hilfe am cLSM sowie alle Mitarbeiter des Sequenzierlabors sowie der Nährboden- und Spülküche.
- Nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Freundin Carolin, ohne die ich vielleicht nie so weit gekommen wäre.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 15.12.2006

Markus Möbs